To besedilo je zgolj informativne narave in nima pravnega učinka. Institucije Unije za njegovo vsebino ne prevzemajo nobene odgovornosti. Verodostojne različice zadevnih aktov, vključno z uvodnimi izjavami, so objavljene v Uradnem listu Evropske unije. Na voljo so na portalu EUR-Lex. Uradna besedila so neposredno dostopna prek povezav v tem dokumentu

►B

UREDBA KOMISIJE (ES) št. 440/2008

z dne 30. maja 2008

o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH)

(Besedilo velja za EGP)

(UL L 142, 31.5.2008, str. 1)

spremenjena z:

		Uradni list		
		št.	stran	datum
►M1	Uredba Komisije (ES) št. 761/2009 z dne 23. julija 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Uredba Komisije (EU) št. 1152/2010 z dne 8. decembra 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Uredba Komisije (EU) št. 640/2012 z dne 6. julija 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Uredba Komisije (EU) št. 260/2014 z dne 24. januarja 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Uredba Komisije (EU) št. 900/2014 z dne 15. julija 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Uredba Komisije (EU) 2016/266 z dne 7. decembra 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Uredba Komisije (EU) 2017/735 z dne 14. februarja 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Uredba Komisije (EU) 2019/1390 z dne 31. julija 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

UREDBA KOMISIJE (ES) št. 440/2008

z dne 30. maja 2008

o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH)

(Besedilo velja za EGP)

Člen 1

Testne metode, ki jih je treba uporabiti za namene Uredbe 1907/2006/ES, so določene v Prilogi k tej uredbi.

Člen 2

Komisija bo po potrebi pregledala testne metode iz te uredbe, da se nadomestijo, zmanjšajo ali izboljšajo poskusi na vretenčarjih.

Člen 3

Vsi sklici na Prilogo V k Direktivi 67/548/EGS se razlagajo kot sklici k tej uredbi.

Člen 4

Ta uredba začne veljati dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Uporablja se od 1. junija 2008.

▼B

PRILOGA

▼M6

Opomba:

Pred uporabo katere koli od naslednjih preskusnih metod za preskušanje snovi, ki jo sestavlja več sestavin (MCS), snovi neznane ali spremenljive sestave, kompleksnega produkta reakcije ali biološkega materiala (UVCB) ali zmesi in kadar uporaba navedenih metod za preskušanje MCS, UVCB ali zmesi v zadevni preskusni metodi ni navedena, je treba proučiti, ali je metoda ustrezna za predvideni regulativni namen.

Če se preskusna metoda uporablja za preskušanje MCS, UVCB ali zmesi, mora biti na voljo čim več zadostnih informacij o njeni sestavi, npr. z navedbo kemijske identitete, kvantitativnega pojavljanja in relevantnih lastnosti njenih sestavin.

▼B

DEL A: METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI

KAZALO

A.1 TALIŠČE/ZMRZIŠČE

A.2 VRELIŠČE

A.3 RELATIVNA GOSTOTA

A.4 PARNI TLAK

A.5 POVRŠINSKA NAPETOST

A.6 TOPNOST V VODI

A.8 PORAZDELITVENI KOEFICIENT

A.9 PLAMENIŠČE

A.10 VNETLJIVOST (TRDNE SNOVI)

A.11 VNETLJIVOST (PLINI)

A.12 VNETLJIVOST (STIK Z VODO)

A.13 PIROFORNE LASTNOSTI TRDNIH SNOVI IN TEKOČIN

A.14 EKSPLOZIVNE LASTNOSTI

A.15 TEMPERATURA SAMOVŽIGA (TEKOČINE IN PLINI)

A.16 RELATIVNA TEMPERATURA SAMOVŽIGA ZA TRDNE SNOVI

A.17 OKSIDACIJSKE LASTNOSTI (TRDNE SNOVI)

A.18 POVPREČNO ŠTEVILO MOLEKULSKE MASE IN PORAZDELITEV MOLEKULSKE MASE POLIMEROV .

A.19 VSEBNOST POLIMEROV NIZKE MOLEKULSKE MASE

A.20 OBNAŠANJE RAZTOPINE/IZVLEČKA POLIMEROV V VODI

A.21 OKSIDATIVNE LASTNOSTI (TEKOČE SNOVI)

A.22 GEOMETRIJSKI SREDNJI PREMER GLEDE NA DOLŽINO VLAKEN

A.23 PORAZDELITVENI KOEFICIENT (1-OKTANOL/VODA): METODA POČASNEGA MEŠANJA

A.24 PORAZDELITVENI KOEFICIENT (N-OKTANOL/VODA), METODA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)\

A.25 DISOCIACIJSKE KONSTANTE V VODI (TITRACIJSKA METODA – SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA – KONDUKTOMETRIČNA METODA)

▼B

A.1 TALIŠČE/ZMRZIŠČE

1. METODA

Večina opisanih metod temelji na smernici za preskušanje OECD(1). Temeljna načela so navedena v virih (2) in (3).

1.1 UVOD

Opisane metode in naprave se uporabljajo za določanje tališča snovi brez kakršnih koli omejitev glede njihove stopnje čistosti.

Izbira metode je odvisna od narave preskusne snovi. Tako bo omejitveni dejavnik to, ali je snov lahko, težko ali nemogoče uprašiti.

Za nekatere snovi je primernejše določanje zmrzišča ali strdišča in standardi za te meritve so tudi vključeni v to metodo.

Kadar zaradi posebnih lastnosti snovi ni mogoče ustrezno izmeriti nobenega od navedenih parametrov, je morda primerna točka tečenja.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Tališče je opredeljeno kot temperatura, pri kateri pride do prehoda iz trdnega v tekoče agregatno stanje pri atmosferskem tlaku, in je enaka zmrzišču.

Ker fazni prehod številnih snovi poteka v temperaturnem območju, se pogosto opiše kot talilno območje.

Pretvorba enot (K v ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: Celzijeva temperatura, stopinja Celzija (^{o}C)

T: termodinamična temperatura, kelvin (K)

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Nekatere snovi za umerjanje so naštete v virih (4).

▼B

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Določi se temperatura (temperaturno območje) faznega prehoda iz trdnega v tekoče stanje ali iz tekočega v trdno stanje. To pomeni, da se med segrevanjem/hlajenjem vzorca preskusne snovi pri atmosferskem tlaku določita temperaturi začetne faze taljenja/zmrzovanja in končne faze taljenja/zmrzovanja. Opisanih je pet vrst metod, to so kapilarna metoda, metode z ogrevalno mizico, metode za določanje zmrzišča, metode termične analize in metoda za določanje točke tečenja (kakor je bila razvita za nafto).

V nekateri primerih je lahko pripravneje izmeriti zmrzišče namesto tališča.

1.4.1 **Kapilarna metoda**

1.4.1.1 *Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo*

V kapilarno cevko damo majhno količino drobno zmlete snovi in jo dobro potlačimo. Cevko segrevamo skupaj s termometrom in med dejanskim taljenjem prilagodimo naraščanje temperature na manj kot približno 1 K/min. Določimo začetno in končno talilno temperaturo.

1.4.1.2 *Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom*

Kakor je opisano v 1.4.1.1, le da sta kapilarna cevka in termometer postavljena v ogrevan kovinski blok; opazujemo ju lahko skozi luknje v bloku.

1.4.1.3 *Fotocelična detekcija*

Vzorec v kapilarni cevki se avtomatično segreva v kovinskem valju. Skozi luknjo v valju se usmeri žarek svetlobe skozi snov na natančno umerjeno fotocelico. Optične lastnosti večine snovi se med taljenjem spremenijo, prej neprozorne postanejo prozorne. Jakost svetlobe, ki doseže fotocelico, naraste in pošlje signal za konec digitalnemu indikatorju, ki odčitava temperaturo na platinskem uporovnem termometru v grelni komori. Ta metoda ni primerna za nekatere močno obarvane snovi.

1.4.2 **Ogrevalna mizica**

1.4.2.1 *Koflerjeva ogrevalna plošča*

Za Koflerjevo ogrevalno ploščo se uporabita dva kosa kovine z različno toplotno prevodnostjo, električno ogrevana, s ploščo, zasnovano tako, da je vzdolž nje sprememba temperature skoraj linearna. Temperatura ogrevalne plošče je lahko od 283 do 573 K in se odčita s posebno napravo, ki vključuje premično kolesce s kazalcem in jezičkom, zasnovano za posamezno ploščo. Za določanje tališča, se snov v tanki plasti nanese neposredno na površino ogrevalne plošče. V nekaj sekundah se pojavi ostra razmejitvena črta med tekočo in trdno fazo. Temperatura na razmejitveni črti se odčita tako, da se nanjo naravna kazalec.

▼B

1.4.2.2 *Talilni mikroskop*

Za določanje tališča z zelo majhnimi količinami materiala se uporablja več mikroskopskih grelnih mizic. Pri večini grelnih mizic se temperatura meri z občutljivim termočlenom, vendar se včasih uporablja tudi živosrebrni termometer. Značilna mikroskopska aparatura z ogrevalnimi mizicami za določanje tališča ima grelno komoro, ki vsebuje kovinsko ploščo, na katero položimo vzorec na objektnem stekelcu. Na sredini kovinske plošče je luknjica, ki omogoča vstop svetlobe s kolektorja mikroskopa. Med uporabo je komora zaprta s stekleno ploščo, ki preprečuje vdor zraka v območje vzorca.

Segrevanje vzorca se uravnava z reostatom. Za zelo natančne meritve pri optično anizotropnih snoveh se lahko uporabi polarizirana svetloba.

1.4.2.3 *Metoda z meniskusom*

Ta metoda se uporablja posebej za poliamide.

Vizualno se določi temperatura, pri kateri se premakne meniskus silikonskega olja, ki je med ogrevalno mizico in krovnim stekelcem na preskusnem vzorcu poliamida.

1.4.3 **Metoda za določanje zmrzišča**

Vzorec se da v posebno epruveto, ta pa v aparaturo za določanje zmrzišča. Vzorec se ohlaja in ves čas rahlo meša in v primernih intervalih se meri temperatura. Ko je temperatura pri nekaj zaporednih odčitkih nespremenjena, se ta temperatura (popravljena z upoštevanjem napake termometra) zapiše kot zmrzišče.

Treba je preprečiti podhladitev, in sicer tako da se vzdržuje ravnotežje med trdno in tekočo fazo.

1.4.4 **Termična analiza**

1.4.4.1 *Diferenčna termična analiza (DTA)*

Pri tej tehniki se beleži razlika v temperaturi snovi in referenčnega materiala v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in na referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (tališče) ali eksotermni (zmrzišče) odmik od bazne črte zapisa temperature.

▼B

1.4.4.2 *Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)*

Pri tej tehniki se beleži razlika v vnosu energije v snov in referenčni material v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ta energija je energija, ki je potrebna za izenačitev temperature snovi in referenčnega materiala. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (tališče) ali eksotermni (zmrzišče) odmik od bazne črte zapisa toplotnega pretoka.

1.4.5 **Točka tečenja**

Ta metoda je bila razvita za nafto in je primerna za oljaste snovi z nizkim tališčem.

Po predhodnem segrevanju se vzorec ohlaja s točno določeno hitrostjo in v intervalih 3 K se opazujejo značilnosti tečenja. Najnižja temperatura, pri kateri se še opazi premikanje snovi, se zapiše kot točka tečenja.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Uporabnost in točnost različnih metod, ki se uporabljajo za določanje tališča/talilnega območja, sta navedeni v naslednji tabeli:

TABELA: UPORABNOST METOD

A. **Kapilarne metode**

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost [1]	Veljavni standard
Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo	da	le za nekatere	273 do 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom	da	le za nekatere	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Fotocelična detekcija	da	za številne z uporabo prilagoditvenih naprav	253 do 573 K	± 0,5 K	

[1] Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.

▼B

B. **Metode z ogrevalnimi mizicami in metode za določanje zmrzišča**

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost (1)	Veljavni standard
Koflerjeva ogrevalna plošča	da	ne	283 do > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Talilni mikroskop	da	le za nekatere	273 do > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metoda z meniskusom	ne	posebej za poliamide	293 do > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metode za določanje zmrzišča	da	da	223 do 573 K	± 0,5 K	npr. BS 4695

(1) Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.

C. **Termična analiza**

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost (1)	Veljavni standard
Diferenčna termična analiza	da	da	173 do 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenčna dinamična kalorimetrija	da	da	173 do 1 273 K	Do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.

D. **Točka tečenja**

Merilna metoda	Snovi, ki jih je mogoče uprašiti	Snovi, ki jih ni mogoče zlahka uprašiti	Temperaturno območje	Ocenjena točnost (1)	Veljavni standard
Točka tečenja	za nafto in oljaste snovi	za nafto in oljaste snovi	223 do 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Odvisno od vrste instrumenta in stopnje čistosti snovi.

1.6 OPIS METOD

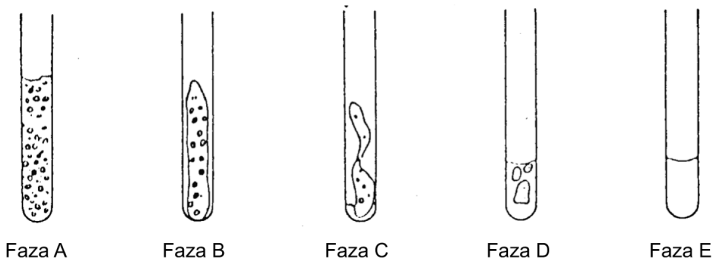
Postopki skoraj vseh preskusnih metod so opisani v mednarodnih in nacionalnih standardih (glej dodatek 1).

1.6.1 **Metode s kapilarno cevko**

Kadar se drobno uprašene snovi počasi segrevajo, se običajno pokažejo talilne faze s slike 1.

▼B

Slika 1



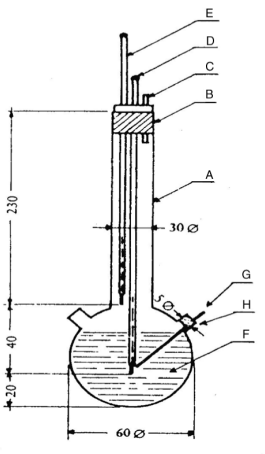
Faza A	(začetek taljenja): drobne kapljice se enakomerno oprimejo notranje stene kapilarne cevke
Faza B	med vzorcem in notranjo steno se zaradi krčenja taline pojavi praznina
Faza C	skrčen vzorec se začne sesedati in utekočinjati
Faza D	na površini se oblikuje popoln meniskus, vendar znatna količina vzorca ostane trdna
Faza E	(zadnja faza taljenja): ni večnobenih trdnih delcev

Pri določanju tališča zapišemo temperaturi na začetku taljenja in v zadnji fazi.

1.6.1.1 *Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo*

Slika 2 prikazuje vrsto standardizirane steklene aparature za merjenje tališča (JIS K 0064); vse specifikacije so v milimetrih.

Slika 2



A: Merilna posoda
B: Zamašek
C: Odprtina za zrak
D: Termometer
E: Pomožni termometer
F: Tekočina za kopel a kapilarna
G: Steklena kapilarna cevka, dolga 80 do 100 mm, z notranjim premerom 1,0 ± 0,2 mm in steno, debelo 0,2 do 0,3 mm
H: Stranska cevka

▼B

Tekočina za kopel:

Izbrati je treba primerno tekočino. Izbira tekočine je odvisna od tališča, ki se določa, npr. tekoči parafin za tališča do največ 473 K, silikonsko olje za tališča do največ 573 K.

Za tališča, višja od 523 K, se lahko uporabi zmes treh delov žveplove kisline in dveh delov kalijevega sulfata (v masnem razmerju). Pri uporabi take zmesi je treba upoštevati primerne varnostne ukrepe.

Termometer:

Uporabljajo se lahko samo termometri, ki izpolnjujejo zahteve naslednjih ali njim enakovrednih standardov:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Postopek:

Suha snov se na drobno upraši v terilnici in da v na enem koncu zataljeno kapilaro, tako da je tesno natlačene snovi v kapilari približno 3 mm. Da bo vzorec enakomerno potlačen, je treba kapilaro z višine približno 700 mm spustiti skozi stekleno cevko navpično na urno steklo.

Napolnjena kapilarna cevka se postavi v kopel, tako da se srednji del bučke termometra z živim srebrom dotika kapilarne cevke na delu, kjer je vzorec. Običajno se kapilarna cevka vstavi v aparaturo pri temperaturi približno 10 K pod tališčem.

Tekočina kopeli se segreva tako, da temperatura narašča približno za 3 K/min. Tekočino je treba mešati. Pri približno 10 K pod pričakovanim tališčem se naraščanje temperature naravna na največ 1 K/min.

Izračun:

Tališče izračunamo na naslednji način:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_{\check{E}})\ n$

pri čemer je:

T = popravljeno tališče v K

T_D = odčitana temperatura na termometru D v K

T_E = odčitana temperatura na termometru E v K

n = število graduacij živosrebrnega stolpca na termometru D na delu, ki gleda iz tekočine.

1.6.1.2 *Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom*

Aparatura:

Sestavljajo jo:

— valjast kovinski blok, katerega zgornji del je votel in predstavlja komoro (glej sliko 3),

— kovinski zamašek z dvema ali več luknjami, ki omogočajo vstavljanje cevk v kovinski blok,

▼B

— grelni sistem za kovinski blok, na primer z električnim uporom, vgrajenim v blok,

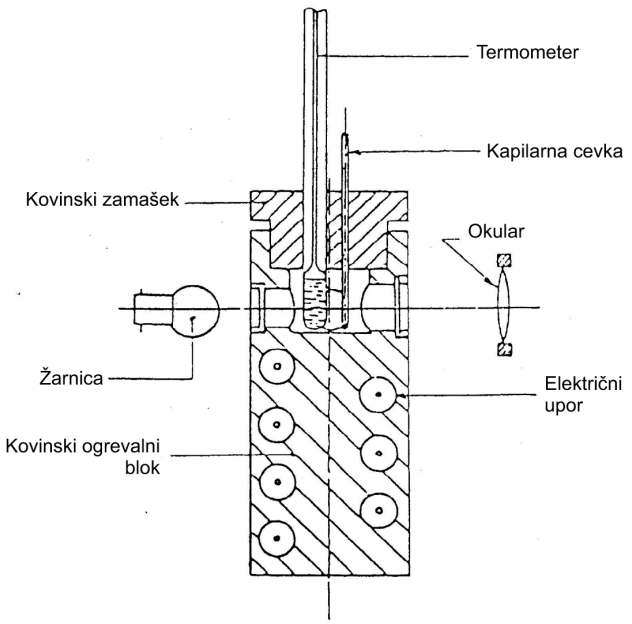
— reostat za uravnavanje dovoda energije, če se uporabi električno gretje,

— štiri okenca iz stekla, odpornega proti vročini, v stranskih stenah komore, diametralno razporejenih pravokotno drug na drugega. Pred enim od okenc je postavljen okular za opazovanje kapilarne cevke. Ostala tri okenca se uporabljajo za osvetljevanje notranjosti komore z žarnicami,

kapilarna cevka iz stekla, odpornega proti vročini, na enem koncu zaprta (glej 1.6.1.1).

Glej standarde, navedene v 1.6.1.1. Lahko se uporabijo tudi termoelektrični instrumenti s primerljivo točnostjo.

Slika 3



1.6.1.3 *Fotocelična detekcija*

Aparatura in postopek:

Aparaturo sestavlja kovinska komora z avtomatiziranim grelnim sistemom. Tri kapilarne cevke se napolnijo v skladu z 1.6.1.1 in postavijo v grelno komoro.

▼B

Za umerjanje aparature je na voljo več linearnih naraščanj temperature in primerno naraščanje temperature se električno naravna na vnaprej določeno konstantno in linearno hitrost naraščanja. Zapisovalniki kažejo dejansko temperaturo grelne komore in temperaturo snovi v kapilarnih cevkah.

1.6.2 **Ogrevalne mizice**

1.6.2.1 *Koflerjeva ogrevalna plošča*

Glej dodatek.

1.6.2.2 *Talilni mikroskop*

Glej dodatek.

1.6.2.3 *Metoda z meniskusom (poliamidi)*

Glej dodatek.

Hitrost segrevanja v območju tališča mora biti manjša od 1 K/min.

1.6.3 **Metode za določanje zmrzišča**

Glej dodatek.

1.6.4 **Termična analiza**

1.6.4.1 *Diferenčna termična analiza*

Glej dodatek.

1.6.4.2 *Diferenčna dinamična kalorimetrija*

Glej dodatek.

1.6.5 **Delovanje točke tečenja**

Glej dodatek.

2. **PODATKI**

V nekaterih primerih je potreben popravek termometra.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— uporabljena metoda,

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) ter predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno,

— ocena točnosti.

Kot tališče se navede srednja vrednost najmanj dveh meritev, ki sta v območju predvidene točnosti (glej tabele).

▼B

Če je razlika med temperaturo na začetku taljenja in tisto v zadnji fazi taljenja znotraj meja točnosti metode, se kot tališče navede temperatura v zadnji fazi taljenja; sicer pa se navedeta obe temperaturi.

Če snov razpade ali sublimira, preden se doseže tališče, se navede temperatura, pri kateri so bile opažene te spremembe.

Navesti je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, str. 803–834.

(3) R. Weissberger éd.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd éd., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, str. 505–515.

▼B

Dodatek

Dodatne tehnične podrobnosti se lahko poiščejo na primer v naslednjih standardih.

1. **Kapilarne metode**

1.1 Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2 Naprave za merjenje tališča s kovinskim blokom

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

2. **Ogrevalne mizice**

2.1 Koflerjeva ogrevalna plošča

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2 Talilni mikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Metoda z meniskusom (poliamidi)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion“ méthode du ménisque

3. **Metode za določanje zmrzišča**

BS 4633	Method for the determination of crystallising point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termična analiza**

4.1 Diferenčna termična analiza

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2 Diferečna dinamična kalorimetrija

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Določanje točke tečenja**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B

A.2 VRELIŠČE

1. METODA

Večina opisanih metod temelji na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v virih (2) in (3).

1.1 UVOD

Tukaj opisane metode in naprave se lahko uporabljajo za tekoče snovi in snovi z nizkim tališčem, pod pogojem da pri njih ne pride do kemične reakcije pri temperaturah pod vreliščem (na primer avto-oksidacije, prerazporeditve, razgradnje itd.). Te metode se lahko uporabljajo za čiste in nečiste tekoče snovi.

Poudarjene so metode s fotocelično detekcijo in termično analizo, ker te metode omogočajo določanje tališča in vrelišča. Poleg tega je meritve mogoče opraviti avtomatsko.

„Dinamična metoda“ ima to prednost, da se lahko uporabi tudi za določanje parnega tlaka ter da ni treba popravljati vrelišča glede na normalni tlak (101,325 kPa), ker se med merjenjem z manostatom lahko naravna normalni tlak.

Opombe:

Vpliv nečistot na določanje vrelišča je v veliki meri odvisen od narave nečistote. Kadar so v vzorcu hlapne nečistote, ki bi lahko vplivale na rezultat, se snov lahko prečisti.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Normalno vrelišče je opredeljeno kot temperatura, pri kateri je parni tlak tekočine enak 101,325 kPa.

Če se vrelišče ne meri pri normalnem atmosferskem tlaku, lahko odvisnost parnega tlaka od temperature opisemo s Clausius-Clapeyronovo enačbo:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + konst.$$

pri čemer je:

P = parni tlak snovi v paskalih

AH_V = izparilna toplota v J mol^{-1}

R = splošna plinska konstanta = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamična temperatura v K

Vrelišče se navede glede na zračni tlak med meritvijo.

▼B

Pretvorbe

Tlak (enote: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(enota „bar“ je še vedno dovoljena, vendar se ne priporoča)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 tor

(enoti „mm Hg“ in „tor“ nista dovoljeni)

1 atm = standardna atmosfera = 101 325 Pa

(enota „atm“ ni dovoljena).

Temperatura (enote: K)

t = T - 273,15

t: Celzijeva temperatura, stopinja Celzija (^{o}C)

T: termodinamična temperatura, kelvin (K)

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Nekatere snovi za umerjanje so naštete v metodah, navedenih v dodatku.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Pet metod za določanje vrelišča (vreliščnega območja) temelji na merjenju vrelišča, dve pa temeljita na termični analizi.

1.4.1 **Določanje z uporabo ebulioskopa**

Ebulioskopi so bili prvotno zasnovani za določanje molekulske mase glede na naraščajoče vrelišče, vendar so primerni tudi za natančno merjenje vrelišča. Zelo preprosta aparatura je opisana v ASTM D 1120-72 (glej Dodatek). Tekočina se segrejeva v tej aparaturi v ravnotežnih pogojih pri atmosferskem tlaku, dokler ne zavre.

1.4.2 **Dinamična metoda**

Ta metoda vključuje merjenje temperature rekondenzacije pare z ustreznim termometrom v povratnem toku med vretjem. Tlak se pri tej metodi lahko spreminja.

1.4.3 **Destilacijska metoda za vrelišče**

Ta metoda vključuje destilacijo tekočine in merjenje temperature rekondenzacije pare ter določanje količine destilata.

▼B

1.4.4 **Metoda po Siwoloboffu**

Vzorec se segreva v cevki, potopljeni v tekočino toplotne kopeli. V cevko z vzorcem se potopi zataljena kapilara, ki v spodnjem delu vsebuje zračni mehurček.

1.4.5 **Fotocelična detekcija**

Po Siwoloboffovem principu se izvede avtomatsko fotoelektrično merjenje z uporabo dvigajočih se mehurčkov.

1.4.6 **Diferenčna termična analiza**

Pri tej tehniki se beleži razlika v temperaturi snovi in referenčnega materiala v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in na referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (vrelišče) odmik od bazne črte zapisa temperature.

1.4.7 **Diferenčna dinamična kalorimetrija**

Pri tej tehniki se beleži razlika v vnosu energije v snov in referenčni material v odvisnosti od temperature, pri čemer se na snovi in referenčnem materialu izvaja isti nadzorovani temperaturni program. Ta energija je energija, potrebna za izenačitev temperature snovi in referenčnega materiala. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, ki vključuje spremembo entalpije, se ta sprememba pokaže kot endotermni (vrelišče) odmik od bazne črte zapisa toplotnega pretoka.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Uporabnost in točnost različnih metod, ki se uporabljajo za določanje vrelišča/vreliščnega območja, sta navedeni v tabeli 1.

Tabela 1

Primerjava metod

Merilna metoda	Ocenjena točnost	Veljavni standard
Ebulioskop	± 1,4 K (do373K) (1) (2) ± 2,5 K (do 600K) (1) (2)	ASTMD 1120-72 (1)
Dinamična metoda	± 0,5 K (do 600 K) (2)	
Destilacijski proces (vreliščno območje)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Po Siwoloboffu	± 2 K (do 600 K) (2)	
Fotocelična detekcija	± 0,3 K (do 373 K) (2)	
Diferenčna termična kalorimetrija	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenčna dinamična kalorimetrija	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do1 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Ta točnost velja le za enostavne naprave, npr. tisto, opisano v ASTM D 1120-72; lahko se izboljša z bolj preciznimi ebulioskopi.

(2) Velja le za čiste snovi. Uporabo v drugačnih razmerah je treba utemeljiti.

▼B

1.6 OPIS METOD

Postopki nekaterih preskusnih metod so opisani v mednarodnih in nacionalnih standardih (glej dodatek).

1.6.1 **Ebulioskop**

Glej dodatek.

1.6.2 **Dinamifha metoda**

Glej preskusno metodo A.4 za določanje parnega tlaka.

Zapišemo temperaturo vrelišča, ugotovljeno pri tlaku 101,325 kPa.

1.6.3 **Destilacijski proces (vreliščno območje)**

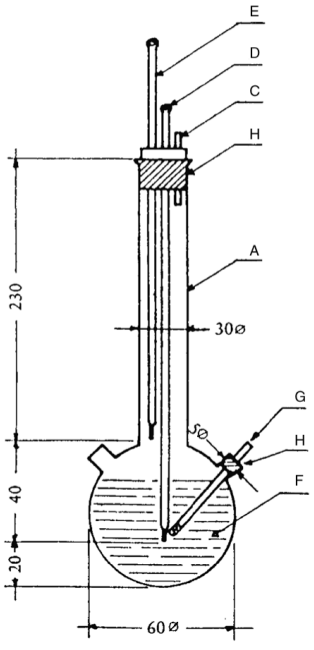
Glej dodatek.

1.6.4 **Metoda po Swiloboffu**

Vzorec se segreva v aparaturi za določanje tališča, v cevki s premerom približno 5 mm (slika 1).

Slika 1 prikazuje vrsto standardizirane aparature za določanje tališča in vrelišča (JIS K 0064) (iz stekla, vse specifikacije v milimetrih).

Slika 1



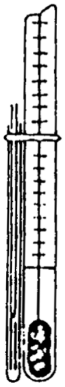
A: Merilna posoda
B: Zamašek
C: Odprtina za zrak
D: Termometer
E; Pomožni termometer
F: Tekočina za kopel
G; Cevka za vzorec, zunanji premer največ 5 mm; vsebuje kapilarno cevko, dolgo približno 100 mm, z notranjim premerom približno 1 mm in steno, debelo približno 0,2 do 0,3 mm
H: Stranska cevka

Kapilarna cevka (vreliščna kapilara), stisnjena približno 1 cm nad spodnjim delom, se da v cevko za vzorec. Doda se toliko preskusne snovi, da je stisnjeni del kapilare pod površino tekočine. Cevka z vzorcem, v kateri je vreliščna kapilara, se bodisi pritrdi na termometer z elastiko bodisi fiksira s podporo s strani (glej sliko 2).

▼B

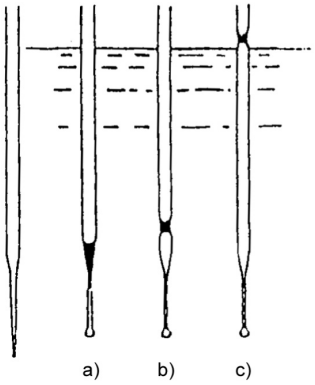
Slika 2

Princip po Siwoloboffu



Slika 3

Prilagojeni princip



Tekočina za kopel se izbere glede na vrelišče. Pri temperaturah do 573 K se lahko uporabi silikonsko olje. Tekoči parafin se lahko uporabi le do 473 K. Segrevanje tekočine kopeli mora biti sprva naravnano tako, da temperatura narašča 3 K/min. Tekočino kopeli je treba mešati. Pri približno 10 K pod pričakovanim vreliščem se segrevanje upočasni, tako da temperatura narašča manj kot 1 K/min. Ko se približujemo vrelišču, začnejo iz vreliščne kapilare hitro izhajati mehurčki.

Vrelišče je temperatura, pri kateri se ob trenutni ohladitvi ustavi izhajanje mehurčkov, tekočina v kapilari pa se začne nenadoma dvigati. Ustrezen odčitek s termometra je vrelišče snovi.

Pri prilagojenem principu (slika 3) se vrelišče določa v tališčni kapilari. Njen konec se raztegne v približno 2 cm dolgo tanko konico (a); vanjo se vsesa majhna količina vzorca. Odprti konec drobne kapilare se zatali, tako da je na koncu ostane zračni mehurček. Med segrevanjem v aparaturi za določanje tališča (b) se zračni mehurček razširi. Vrelišče sovpada s temperaturo, pri kateri zamašek iz snovi doseže nivo površine tekočine kopeli (c).

1.6.5 **Fotocelična detekcija**

Vzorec se segreva v kapilarni cevki znotraj segrevanega kovinskega bloka.

Skozi ustrezne luknje v bloku se usmeri svetlobni žarek skozi snov na natančno umerjeno fotocelico.

Med naraščanjem temperature vzorca iz vreliščne kapilare izhajajo posamezni mehurčki. Ko se doseže vrelišče, se količina mehurčkov zelo poveča. To povzroči spremembo v jakosti svetlobe, ki jo beleži fotocelica, kar da signal za konec indikatorju, ki odčitava temperaturo s platinskega uporovnega termometra znotraj bloka.

Ta metoda je se posebej uporabna, ker omogoča določanje vrelišča pri temperaturi, nižji od sobne, vse do 253,15 K (–20 °C) ne da bi bilo treba aparaturo kakor koli spreminjati. Instrument moramo le položiti v hladno kopel.

▼B

1.6.6 **Termična analiza**

1.6.6.1 *Diferenčna termična analiza*

Glej dodatek.

1.6.6.1 *Diferenčna dinamična kalorimetrija*

Glej dodatek.

2. **PODATKI**

Pri majhnih odstopanjih od normalnega tlaka (največ ± 5 kPa) se vrelišča normalizirajo na T_n po naslednji enačbi Sidneya Younga:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

pri čemer je:

Δp = (101,325 – p) [pazi na predznak]

P = izmerjeni tlak v kPa

f_T = razmerje med spremembo vrelišča in tlakom v K/kPa

T = izmerjeno vrelišče v K

T_n = vrelišče, popravljeno na normalni tlak, v K

V zgoraj navedenih mednarodnih in nacionalnih standardih so korekcijski faktorji za temperature, f_T, in enačbe za njihove približke za mnoge snovi.

Na primer, metoda DIN 53171 navaja naslednje okvirne korekcije za topila v barvah:

Tabela 2

Temperatura – korekcijski faktorji f_T

Temperatura T (K)	Korekcijski faktor f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— uporabljena metoda,

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno,

— ocena točnosti.

Kot vrelišče se navede srednja vrednost najmanj dveh meritev, ki sta v območju predvidene točnosti (glej tabelo 1).

Navedejo se izmerjena vrelišča in njihova srednja vrednost ter tlak(i), pri katerih so bile meritve opravljene, v kPa. Tlak naj bo po možnosti blizu normalnemu atmosferskemu tlaku.

Navesti je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, Volume II.

(3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Dodatek

Dodatne tehnične podrobnosti se lahko poiščejo na primer v naslednjih standardih:

1. **Ebulioskop**

1.1 Naprave za merjenje tališča s tekočinsko kopeljo

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destilacijski proces (vreliščno območje)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation:determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenčna termična analiza in diferenčna dinamična kalorimetrija**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3 RELATIVNA GOSTOTA

1. METODA

Opisane metode temeljijo na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v viru (2).

1.1 UVOD

Opisane metode za določanje relativne gostote se uporabljajo za trdne in tekoče snovi, brez kakršnih koli omejitev glede njihove stopnje čistosti. Različne metode, ki se uporabijo, so navedene v tabeli 1.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Relativna gostota, D_4^{20}, trdnih snovi ali tekočin je razmerje med maso volumna preskusne snovi pri 20 °C in maso enakega volumna vode pri 4 °C. Relativna gostota nima enote.

Gostota snovi, ρ, je količnik njene mase, m, in volumna, V.

Gostota, ρ, se v enotah SI izrazi v kg/m^3.

1.3 REFERENČNE SNOVI (1) (3)

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP METOD

Uporabljajo se štiri vrste metod.

1.4.1 **Vzgonske metode**

1.4.1.1 *Hidrometer* (za tekoče snovi)

Dovolj točno in hitro je gostoto mogoče določiti s plavajočimi hidrometri, ki omogočajo sklepanje o gostoti tekočine glede na globino potopitve z odčitavanjem z graduirane lestvice.

1.4.1.2 *Hidrostatska tehtnica* (za tekoče in trdne snovi)

Za določitev gostote vzorca se lahko uporabi razlika med njegovo maso, izmerjeno na zraku, in tisto, izmerjeno v primerni tekočini (npr. vodi).

V primeru trdnih snovi je izmerjena gostota reprezentativna le za uporabljeni vzorec. Pri določanju gostote tekočin, telo z znanim volumnom V, najprej stehtamo na zraku, potem pa še v tekočini.

1.4.1.3 *Metoda s potopljenim telesom* (za tekoče snovi) (4)

Pri tej metodi se gostota tekočine določi iz razlike med rezultati tehtanja tekočine pred in po potopitvi telesa z znanim volumnom vanjo.

▼B

1.4.2 **Piknometrske metode**

Za trdne snovi ali tekočine se lahko uporabijo piknometri različnih oblik in znanih volumnov. Gostota se izračuna iz razlike med maso polnega in maso praznega piknometra ter njegovega znanega volumna.

1.4.3 **Piknometer s primerjanjem zraka** (za trdne snovi)

Gostota trdne snovi v kakršni koli obliki se lahko izmeri s piknometrom s primerjanjem plina pri sobni temperaturi. Volumen snovi se izmeri na zraku ali v inertnem plinu v valju s spremenljivim umerjenim volumnom. Za izračun gostote se po končanem merjenju volumna opravi ena meritev mase.

1.4.4 **Oscilacijski denzitometer** (5) (6) (7)

Gostota tekočine se lahko izmeri z oscilacijskim denzitometrom. Mehanski oscilator, oblikovan kot U-cev, naj vibrira s svojo resonančno frekvenco, ki je odvisna od njegove mase. Ko se doda vzorec, se resonančna frekvenca oscilatorja spremeni. Aparaturo je treba umeriti z dvema tekočima snovema, katerih gostoti sta znani. Po možnosti se izbereta snovi, katerih gostoti pokrivata merjeno območje.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Uporabnost različnih metod za določanje relativne gostote je navedena v tabeli.

1.6 OPIS METOD

Primeri standardov, ki so vir dodatnih tehničnih podatkov, so navedeni v dodatku.

Preskusi morajo biti izvedeni pri 20 °C in vključevati najmanj dve meritvi.

2. **PODATKI**

Glej standarde.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— uporabljena metoda,

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno.

Relativna gostota, D_4^{20}, se navede, kakor je opredeljeno v 1.2, skupaj z agregatnim stanjem merjene snovi.

Navesti je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

▼B

Tabela

Uporabnost metod

Merilna metoda	Gostota		Največja možna dinamična viskoznost	Veljavni standardi
	trdna snov	tekočina		
1.4.1.1 Hidrometer		da	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2 Hidrostatska tehtnica				
(a) trdne snovi	da			ISO 1183 (A)
(b) tekočine		da	5 Pa s	ISO 901 in 758
1.4.1.3 Metoda s potopljenim telesom		da	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Piknometer				ISO 3507
(a) trdne snovi	da			ISO 1183(B), NF T 20-053
(b) tekočine		da	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Piknometer s primerjanjem zraka	di			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oscilacijski denzitometer		da	5 Pa s	

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. II, 427–430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen -Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Dodatek

Glede dodatnih tehničnih podrobnosti so lahko v pomoč na primer naslednji standardi:

1. **Vzgonske metode**

1.1 Hidrometer

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hidrostatska tehtnica

Za trdne snovi

ISO 1183	A metode: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Za tekoče snovi

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3 Metoda s potopljenim telesom

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Piknometrske metode**

2.1 Za tekoče snovi

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ m^2 s^{-1} at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary – stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

▼B

2.2	Za trdne snovi	
	ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
	NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Piknometer s primerjanjem zraka**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4 PARNI TLAK

1. METODA

Ta metoda je enakovredna OECD TG 104 (2004).

1.1 UVOD

Ta revidirana različica metode A.4(1) dodatno vključuje efuzijsko metodo: izotermično termogravimetrijo, namenjeno za snovi z zelo nizkimi tlaki (do 10^{-10} Pa). Odvisno od zahtev postopka, zlasti pri določanju parnega tlaka snovi z nizkim parnim tlakom, se ponovno ocenijo še drugi postopki za uporabo te metode glede na druga območja uporabe.

V termodinamičnem ravnotežju je parni tlak čiste snovi odvisen samo od temperature. Temeljna načela so opisana drugje (2)(3).

Ni enega samega merilnega postopka, ki bi bil uporaben za celotno območje parnih tlakov od manj kot 10^{-10} do 10^5 Pa. Ta metoda vključuje osem metod za merjenje parnega tlaka, ki jih je mogoče uporabiti za različna območja parnih tlakov. Različne metode se primerjajo glede na uporabnost in merilno območje iz tabele 1. Metode se lahko uporabljajo samo za snovi, ki v pogojih preskusa ne razpadejo. Kadar preskusnih metod zaradi tehničnih razlogov ni mogoče uporabiti, se parni tlak lahko tudi oceni, priporočena ocenjevalna metoda je navedena v Dodatku.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Parni tlak snovi je opredeljen kot tlak nasičene pare nad trdno ali tekočo snovjo.

Za tlak je treba uporabljati enoto SI, tj. pascal (Pa). V preteklosti uporabljane enote, skupaj s pretvorbnimi faktorji, so navedene spodaj:

1 torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfera	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

Enota SI za temperaturo je kelvin (K). Za pretvorbo stopinj Celzija v kelvine se uporablja naslednja formula:

$$T = t + 273{,}15$$

pri čemer je T temperatura v kelvinih ali termodinamična temperatura, t pa temperatura v stopinjah Celzija.

▼**M1**

Tabela 1

Merilna metoda	Snovi		Ocena ponovljivosti	Ocena obnovljivosti	Priporočeno območje
	v trdnem stanju	v tekočem stanju			
Dinamična metoda	nizko tališče	Da	do 25 % 1 do 5 %	do 25 % 1 do 5 %	10^3 Pa do 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa do 10^5 Pa
Statična metoda	Da	Da	5 do 10 %	5 do 10 %	10 Pa do 10^5 Pa 10^{-2} Pa do 10^5 Pa (1)
Izoteniskopska metoda	Da	Da	5 do 10 %	5 do 10 %	10^2 Pa do 10^5 Pa
Efuzijska metoda: parnotlačna tehtnica	Da	Da	5 do 20 %	do 50 %	10^{-3} do 1 Pa
Efuzijska metoda: Knudsenova celica	Da	Da	10 do 30 %	—	10^{-10} do 1 Pa
Efuzijska metoda: izotermična termogravimetrija	Da	Da	5 do 30 %	do 50 %	10^{-10} do 1 Pa
Metoda nasičenega plina	Da	Da	10 do 30 %	do 50 %	10^{-10} do 10^3 Pa
Metoda z rotorjem	Da	Da	10 do 20 %	—	10^{-4} do 0,5 Pa

(1) Pri uporabi manometra kapacitivnosti

1.3 PRINCIP PRESKUSA

V splošnem se parni tlak določa pri različnih temperaturah. V omejenem temperaturnem območju je logaritem parnega tlaka čiste snovi linearna funkcija obratne vrednosti termodinamične temperature v skladu s poenostavljeno Clausius-Clapeyronovo enačbo:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + konstana$$

pri čemer je:

p = parni tlak snovi v pascalih

ΔHv = izparilna toplota v J mol^{-1}

R = splošna plinska konstanta, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamična temperatura v K

▼**M1**

1.4 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabljati. Služijo predvsem za občasno preverjanje učinkovitosti metode, pa tudi za omogočanje primerjave med rezultati različnih metod.

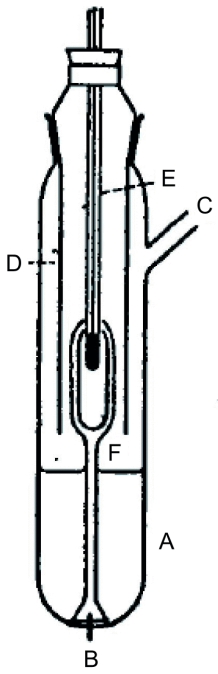
1.5 OPIS METODE

1.5.1 **Dinamična metoda (Cottrellova metoda)**

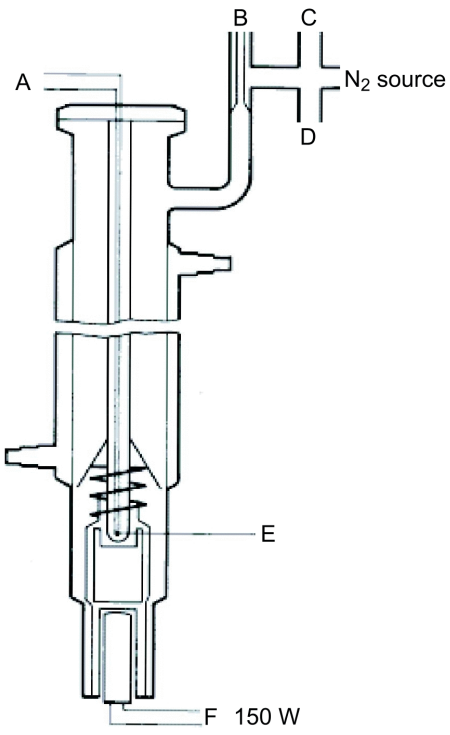
1.5.1.1 *Princip*

Parni tlak se določi z merjenjem vrelišča snovi pri različnih točno določenih tlakih med približno 10^3 in 10^5 Pa. Ta metoda se priporoča tudi za določitev vrelišča. Za ta namen je uporabna do 600 K. Vrelišča tekočin so na globini 3 do 4 cm zaradi hidrostatičnega tlaka tekočine približno 0,1 °C višja kot na površini. Pri Cottrellovi metodi (4) se termometer namesti v paro nad površino tekočine, vrela tekočina pa se neprestano črpa prek bučke termometra. Bučko prekriva tanka plast tekočine, ki je v ravnotežju s paro pri atmosferskem tlaku. Termometer zato kaže pravo vrelišče, brez napak zaradi prevelikega segrevanja ali hidrostatičnega tlaka. Črpalka, ki jo je prvič uporabil Cottrell, je prikazana na sliki 1. Vrela tekočina je v cevki A. Platinasta žica B, ki je zatesnjena v dno, spodbuja enakomerno vrenje. Stranska cevka C je napeljana v kondenzator, obloga D pa mrzlemu kondenzu preprečuje stik s termometrom E. Ko tekočina v A vre, se mehurčki in tekočina, ki se ujamejo v liju, preko dveh ročic črpalke F razlijejo čez bučko termometra.

Slika 1



Slika 2



▼**M1**

Cottrellova črpalka (4)

A: Termočlen

B: Vakuumski pufrski volumen

C: Merilnik tlaka

D: Vakuum

E: Merilna točka

F: Grelni element, približno 150 W

1.5.1.2 *Aparatura*

Zelo natančna aparatura, ki uporablja Cottrellov princip, je prikazana na sliki 2. Sestavljena je iz cevke z vrelnim delom v spodnjem delu, hladilnikom v srednjem delu in odtočno cevko ter prirobnico v zgornjem delu. Cottrellova črpalka se namesti v vrelni del, ki se segreva z električnim kartušnim grelnikom. Temperatura se meri s termočlenom v plašču ali uporovnim termometrom, ki se vstavi skozi prirobnico na vrhu. Izhod se poveže s sistemom za urejanje tlaka. Ta je sestavljen iz vakuumske črpalke, pufrskega volumna, manostata za spuščanje dušika za urejanje tlaka in manometra.

1.5.1.3 *Postopek*

Snov se namesti v vrelni del. Pri neuprašenih trdnih snoveh lahko nastanejo težave, ki pa se včasih lahko odpravijo s segrevanjem hladilnega plašča. Aparatura se zatesni pri robnici in snov razplini. Penečih snovi ni mogoče meriti s to metodo.

Nato se nastavi najnižji želeni tlak ter vključi gretje. Hkrati se senzor temperature poveže z zapisovalnikom.

Ravnotežje je doseženo, ko se pri konstantnem tlaku zabeleži konstantno vrelišče. Preprečiti je treba zlasti sunkovito udarjanje med vrenjem. Poleg tega se mora kondenzacija v hladilniku popolnoma končati. Kadar se določa parni tlak trdnih snovi z nizkim tališčem, je treba paziti, da se hladilnik ne zamaši.

Potem ko se zabeleži točka ravnotežja, se nastavi višji tlak. Postopek se nadaljuje na enak način, dokler ni dosežen tlak 10^5 Pa (skupaj približno 5 do 10 merilnih točk). Za potrditev je treba ponoviti točke ravnotežja pri padajočih tlakih.

1.5.2 **Statična metoda**

1.5.2.1 *Princip*

Pri statični metodi (5) se parni tlak pri termodinamičnem ravnotežju določi pri navedeni temperaturi. Ta metoda je primerna za snovi ter večkomponentne tekočine in trdne snovi v območju od 10^{-1} do 10^5 Pa in, ob zadostni pazljivosti, tudi v območju 1 do 10 Pa.

▼**M1**

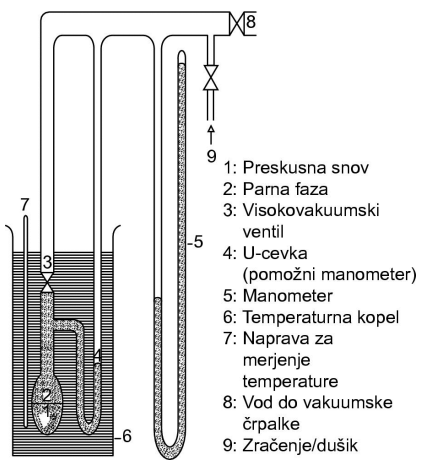
1.5.2.2 *Aparatura*

Oprema je sestavljena iz kopeli s konstantno temperaturo (z natančnostjo ± 0,2 K), posode za vzorec, povezane z vakuumsko cevjo, manometra in sistema za urejanje tlaka. Komora za vzorec (slika 3a) je povezana z vakuumsko cevjo preko ventila in diferencialnega manometra (U-cevke, ki vsebuje ustrezno manometrsko tekočino), ki služi kot ničelni indikator. Za uporabo v diferencialnem manometru so primerni živo srebro, silikoni in ftalati, odvisno od območja tlaka in kemijskih lastnosti preskusne snovi. Zaradi varovanja okolja pa se je treba uporabi živega srebra izogibati, če je to mogoče. Preskusna snov se ne sme vidno topiti v tekočini v U-cevki ali z njo reagirati. Namesto U-cevke se lahko uporabi merilnik tlaka (slika 3b). Za manometer se lahko uporabijo živo srebro za območje od normalnega zračnega tlaka do 10^2 Pa ter silikonska olja in ftalati pri območju pod 10^2 Pa do 10 Pa. Obstajajo tudi drugi merilniki tlaka, ki se lahko uporabljajo pod 10^2 Pa, membranski manometri, ki se lahko segrevajo, pa se lahko uporabljajo tudi pod 10^{-1} Pa. Temperatura se meri ob zunanji steni posode z vzorcem ali v sami posodi.

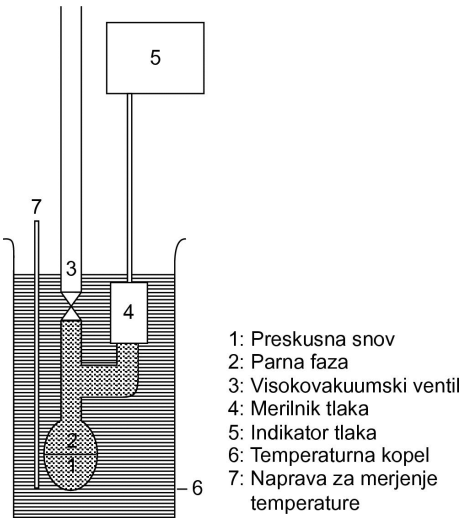
1.5.2.3 *Postopek*

S pomočjo aparature, kakor je prikazana na sliki 3a, se U-cevka napolni z izbrano tekočino, ki jo je treba pred odčitavanjem razpliniti pri zvišani temperaturi. V aparaturo se da preskusna snov in razplini pri znižani temperaturi. Pri večkomponentnih vzorcih mora biti temperatura dovolj nizka, da se sestava snovi zagotovo ne spremeni. Vzpostavljanje ravnotežja je mogoče pospešiti z mešanjem. Vzorec se lahko ohladi s tekočim dušikom ali suhim ledom, paziti pa je treba, da zrak ali tekočina v črpalki ne kondenzira. Ob odprtem ventilu nad vzorčno posodo se nekaj minut izsesava zrak. Postopek razplinjevanja se po potrebi večkrat ponovi.

Slika 3a



Slika 3b



▼**M1**

Ko se vzorec segreva in je ventil zaprt, parni tlak narašča. To spremeni ravnotežje tekočine v U-cevki. Za izravnavo tega učinka se v aparaturo spusti dušik ali zrak, dokler ni indikator tlaka spet na ničli. Tlak, potreben za to, se lahko odčita z manometra ali zelo preciznega instrumenta. Ta tlak ustreza parnemu tlaku snovi pri tej merilni temperaturi. Pri uporabi aparature, prikazane na sliki 3b, se parni tlak odčita neposredno.

Parni tlak se določi pri ustrezno majhnih temperaturnih intervalih (skupaj približno 5 do 10 merilnih točk) do želenega maksimuma.

Za preveritev je treba meritve ponoviti pri nizkih temperaturah. Če vrednosti, dobljene pri ponovljenih meritvah, ne sovpadajo z dobljeno krivuljo za naraščajočo temperaturo, je to lahko posledica enega od naslednjih vzrokov:

(i) v vzorcu je še vedno zrak (npr. snovi z veliko viskoznostjo) ali snovi z nizkim vreliščem, ki se sprosti(-jo) med segrevanjem;

(ii) v proučevanem temperaturnem območju snov kemično reagira (npr. razpada, polimerizira).

1.5.3 **Metoda izoteniskopa**

1.5.3.1 *Princip*

Izoteniskop (6) temelji na principu statične metode. Ta metoda zajema namestitev vzorca v bučko, v kateri se ohranja konstantna temperatura in ki je povezana z manometrom ter vakuumsko črpalko. Nečistoče, ki so bolj hlapne kot snov, se odstranijo z razplinjevanjem pri znižanem tlaku. Parni tlak vzorca pri izbranih temperaturah se uravnava z znanim tlakom inertnega plina. Izoteniskop je bil razvit za merjenje parnega tlaka določenih tekočih ogljikovodikov, vendar ga je mogoče uporabiti tudi za proučevanje trdnih snovi. Ta metoda običajno ni primerna za večkomponentne sisteme. Pri vzorcih, ki vsebujejo nehlapne nečistoče, lahko rezultati vsebujejo majhne napake. Priporočeno območje je od 10^2 do 10^5 Pa.

1.5.3.2 *Aparatura*

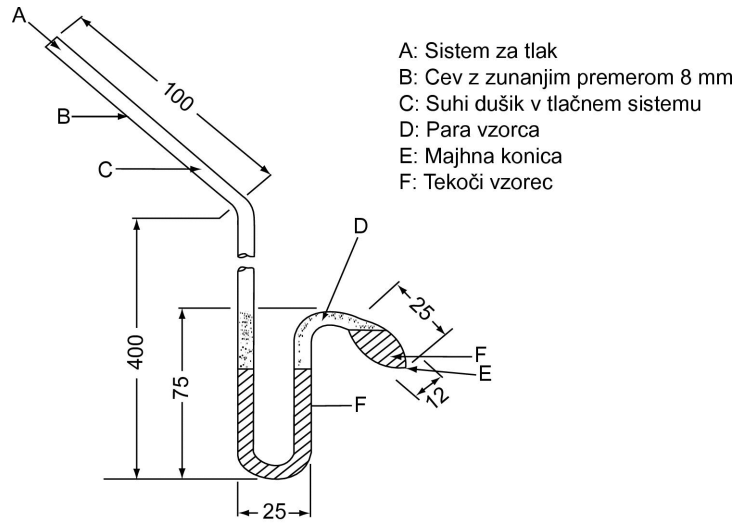
Primer merilne naprave je prikazan na sliki 4. Popoln opis je mogoče najti v ASTM D 2879–86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3 *Postopek*

Pri tekočinah se sama snov uporabi kot tekočina v diferencialnem manometru. V izoteniskop se vlije zadostna količina tekočine, da se napolnita bučka in krajši krak manometrskega dela. Izoteniskop se pritrdi na vakuumski sistem in odzrači, nato pa napolni z dušikom. Odzračevanje in splakovanje sistema se dvakrat ponovi, da se odstrani ves kisik. Napolnjen izoteniskop se postavi v vodoraven položaj, tako da se vzorec razlije v tanko plast v vzorčni bučki in manometrskem delu. Tlak v sistemu se zmanjša na 133 Pa in vzorec se počasi segreva, dokler ravno ne začne vreti (odstranitev raztopljenih plinov). Izoteniskop se nato postavi tako, da se vzorec vrne v bučko in krajši krak manometra ter se oba popolnoma napolnita s tekočino. Vzdržuje se tlak 133 Pa. Podaljšana konica bučke z vzorcem se segreva nad majhnim plamenom, dokler se sproščene pare vzorca toliko ne razširijo, da izpodrinejo del vzorca iz zgornjega dela bučke in kraka manometra, ga potisnejo v manometrski del izoteniskopa, in tako ustvarijo s parami nasičen prostor brez dušika. Izoteniskop se nato postavi v kopel s konstantno temperaturo, tlak dušika pa se naravna tako, da je enak tlaku vzorca. Ob ravnotežju je parni tlak dušika enak parnemu tlaku snovi.

Slika 4



(Mere v mm)

Pri trdnih snoveh se odvisno od območja tlaka in temperature uporabljajo manometrske tekočine, kot so silikonske tekočine ali ftalati. Izboklina na daljšem kraku izoteniskopa se napolni z razplinjeno manometrsko tekočino. Potem se preskusna trdna snov da v bučko in razplini pri zvišani temperaturi. Nato se izoteniskop nagne tako, da manometrska tekočina steče v U-cevko.

▼M1

1.5.4 **Efuzijska metoda: parnotlačna tehtnica** (7)

1.5.4.1 *Princip*

Vzorec preskusne snovi se segreje v majhni peči in namesti v odzračen stekleni zvon. Peč se pokrije s pokrovom, na katerem so majhne luknje z znanimi premeri. Para snovi, ki uhaja skozi eno izmed lukenj, se usmeri v skodelico zelo natančne tehtnice, ki je tudi zaprta v odzračenem steklenem zvonu. Pri nekaterih različicah je skodelica tehtnice obdana s hladilno posodo, ki zagotavlja odvajanje toplote navzven s termično prevodnostjo, in se ohlaja s sevanjem, zato da uhajajoča para kondenzira na njej. Moment curka pare deluje kot sila na tehtnico. Tlak pare je mogoče izpeljati na dva načina: neposredno od sile na skodelico tehtnice, pa tudi iz hitrosti izparevanja s pomočjo Hertz-Knudsenove enačbe (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\,\pi RT \times 10^3}{M}}$$

pri čemer je:

G = hitrost izhlapevanja (kg s^{-1} m^{-2})

M = molska masa (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = splošna plinska konstanta (J mol^{-1} K^{-1})

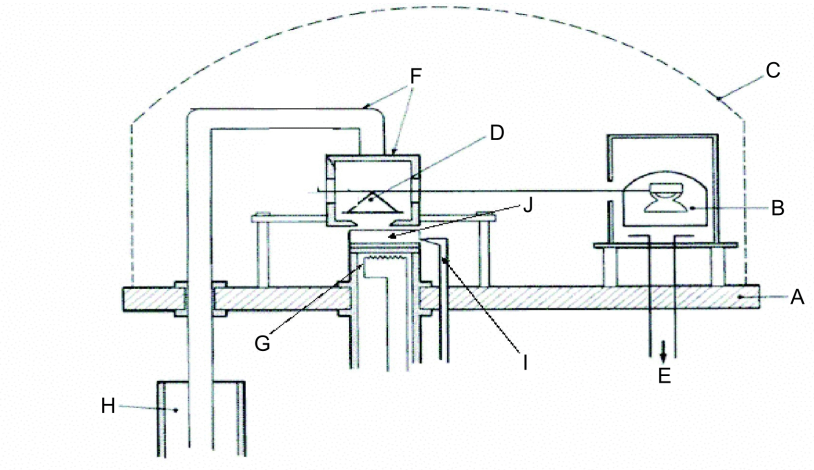
p = parni tlak (Pa)

Priporočeno območje je od 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2 *Aparatura*

Glavni princip aparature je prikazan na sliki 5.

Slika 5



A:	Osnovna plošča	F:	Hladilna posoda in hladilna palica
B:	Inštrument z vrtljivo tuljavo	G:	Uparjalna peč
C:	Stekleni zvon	H:	Dewarjeva posoda s tekočim dušikom
D:	Tehtnica s skodelico	I:	Merjenje temperature vzorca
E:	Naprava za merjenje vakuuma	J:	Preskusna snov

▼M1

1.5.5 **Efuzijska metoda: Knudsenova celica**

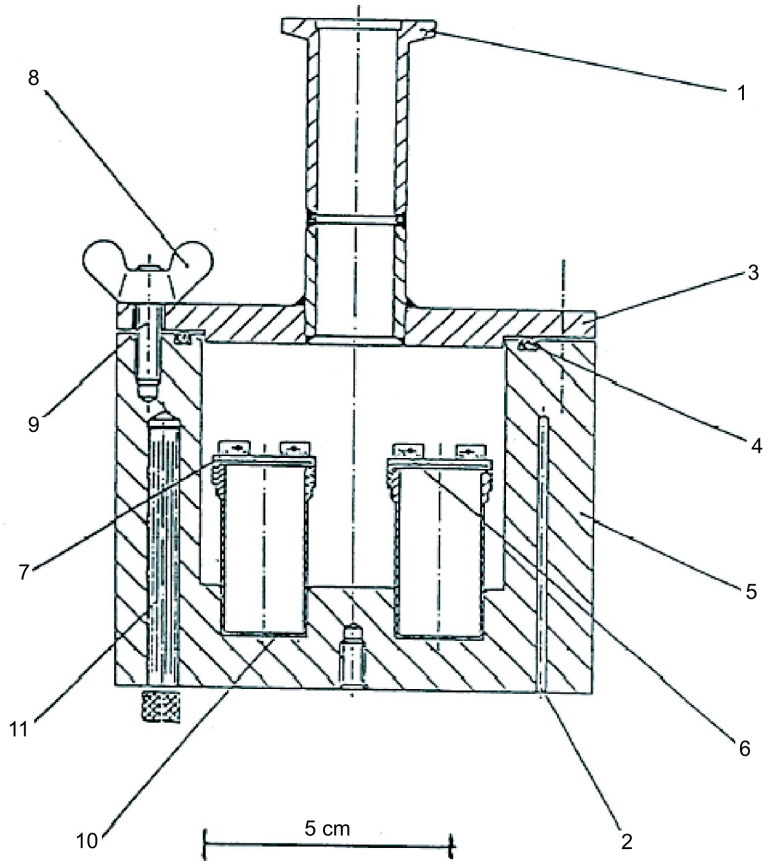
1.5.5.1 *Princip*

Ta metoda temelji na oceni mase preskusne snovi, ki v obliki pare zapusti Knudsenovo celico (8) v časovni enoti skozi mikroodprtino v pogojih ultra visokega vakuuma. Masa izhajajoče pare se lahko ugotovi tako, da se bodisi določi izguba mase celice bodisi kondenzira para pri nizki temperaturi in določi količina izhlapele snovi s kromatografsko analizo. Parni tlak se izračuna z uporabo Hertz-Knudsenovega razmerja (glej točko 1.5.4.1) s korekcijskimi faktorji, ki so odvisni od parametrov aparature (9). Priporočeno območje je 10^{-10} to 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 *Aparatura*

Glavni princip aparature je prikazan na sliki 6.

Slika 6



1:	Povezava z vakuumom	7:	Navojni pokrov
2:	Luknje v platinskem uporovnem termometru ali sistemi za merjenje in nadzorovanje temperature	8:	Krilne matice
3:	Pokrov vakuumske posode	9:	Vijaki
4:	O-tesnilo	10:	Efuzijske celice iz nerjavečega jekla
5:	Aluminijasta vakuumska posoda	11:	Grelni vložki
6:	Naprava za pritrjevanje in odstranjevanje efuzijskih celic		

▼M1

1.5.6 **Efuzijska metoda: izotermična termogravimetrija**

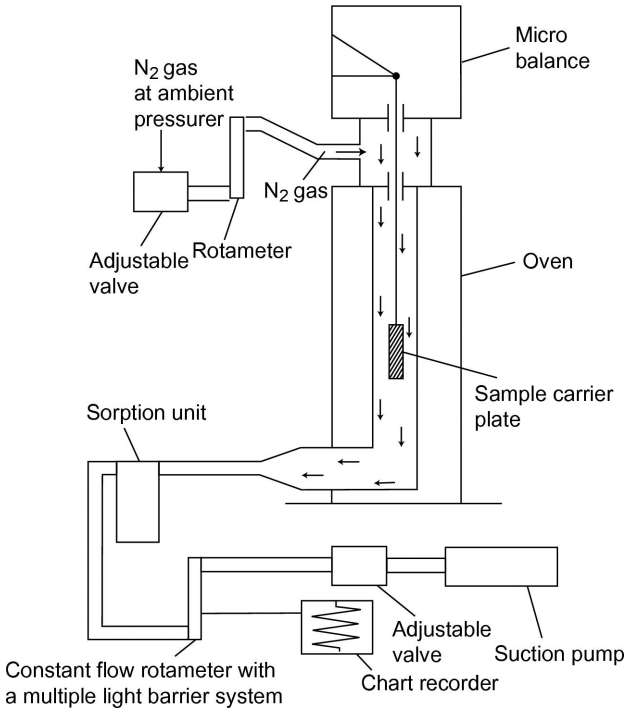
1.5.6.1 *Princip*

Ta metoda temelji na določitvi pospešenih hitrosti izhlapevanja preskusne snovi pri povišanih temperaturah in zračnem tlaku s postopkom termogravimetrije (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Hitrosti izhlapevanja v_T nastanejo pri izpostavljanju izbrane snovi počasi tekoči atmosferi inertnega plina in spremljanju izgube teže pri opredeljenih izotermičnih temperaturah T v kelvinih v ustreznih časovnih obdobjih. Parni tlaki p_T se izračunajo iz vrednosti v_T na podlagi linearnega razmerja med logaritmom parnega tlaka in logaritmom hitrosti izhlapevanja. Po potrebi se izvede ekstrapolacija na temperaturi 20 in 25 °C s pomočjo regresijske analize log p_T v odvisnosti od 1/T. Ta metoda je primerna za snovi s parnimi tlaki do 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) in s čistostjo, ki je kar najbližje 100 %, da ne pride do napačne razlage izmerjenih izgub teže.

1.5.6.2 *Aparatura*

Glavni princip postavitve preskusa je prikazan na sliki 7.

Slika 7



Mimo nosilne plošče z vzorcem, obešene na mikrotehtnici v komori s stalno temperaturo, je speljan tok suhega dušikovega plina, ki odnaša uparjene molekule preskusne snovi. Ko plinski tok zapusti komoro, se očisti v napravi za sorpcijo.

1.5.6.3 *Postopek*

Preskusna snov se nanese na površino hrapave steklene plošče v enakomerni plasti. Pri trdnih snoveh se plošča enakomerno zmoči z raztopino snovi v ustreznem topilu in posuši v inertni atmosferi. Za izvedbo meritev se prevlečena plošča obesi v termogravimetrični analizator, nato pa se izguba teže neprekinjeno meri kot funkcija časa.

▼M1

Hitrost izparevanja v_T pri dani temperaturi se izračuna iz zmanjšanja mase Δm plošče z vzorcem s pomočjo naslednje enačbe:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}} \right)$$

kjer je F površina prevlečenih preskusnih snovi, običajno površina plošče z vzorcem, t pa je čas, v katerem se je masa zmanjšala za Δm.

Parni tlak p_T se izračuna na podlagi njegove funkcije hitrosti izparevanja v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D\ \log\ v_T$$

kjer sta C in D konstanti, specifični za uporabljeno preskusno postavitev in odvisni od premera merilne komore ter hitrosti pretoka plina. Ti konstanti se določita enkrat, in sicer z merjenjem nabora snovi z znanimi parnimi tlaki in regresijo log p_T v odvisnosti od log v_T (11)(21)(22).

Razmerje med parnim tlakom p_T in temperaturo T v kelvinih je podano z

$$\mathrm{Log}\ p_T = A + B\ 1/T$$

kjer sta A in B konstanti, pridobljeni z regresijo log p_T v odvisnosti od 1/T. S to enačbo je mogoče z interpolacijo izračunati parni tlak za katero koli drugo temperaturo.

1.5.7 **Metoda z nasičenjem plina** (23)

1.5.7.1 *Princip*

Inertni plin se pri sobni temperaturi in pri znanem pretoku spelje skozi oziroma čez vzorec preskusne snovi, in sicer dovolj počasi, da se zagotovi nasičenje. Ključnega pomena je, da v plinski fazi nastopi nasičenje. Prenesena snov se ujame, običajno s pomočjo sorbenta, nato se določi njena količina. Za določitev količine snovi, ki jo prenese znana količina nosilnega plina, se namesto lovljenja pare in poznejše analize lahko uporabijo neposredne analitske tehnike, kot je kromatografija. Parni tlak se izračuna ob predpostavki, da se upošteva zakon idealnega plina in da je skupni tlak mešanice plinov enak vsoti tlakov posameznih plinov. Delni tlak preskusne snovi, tj. parni tlak, se izračuna iz znane skupne prostornine plina in iz teže prenesenega materiala.

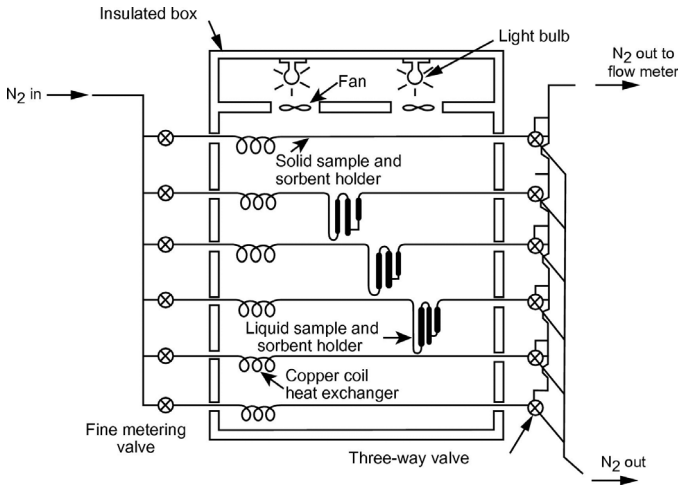
Postopek z nasičenjem plina se lahko uporablja za trdne ali tekoče snovi. Uporabiti ga je mogoče za parne tlake do 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metoda je najzanesljivejša za parne tlake, nižje od 10^3 Pa. Pri tlakih nad 10^3 Pa so parni tlaki običajno precenjeni, najverjetneje zato, ker se tvorijo aerosoli. Ker se meritve parnega tlaka izvajajo pri sobni temperaturi, ni potrebe za ekstrapolacijo podatkov iz visokih temperatur, zato se ekstrapolacija pri visokih temperaturah, ki pogosto povzroča resne napake, ne izvaja.

1.5.7.2 *Aparatura*

Ta postopek zahteva uporabo posode s konstantno temperaturo. Na skici na sliki 8 je prikazana posoda s tremi pripravami za trdne in tremi pripravami za tekoče vzorce, ki omogočajo trojno analizo trdnega ali tekočega vzorca. Natančnost nadzora temperature je na ± 0,5 °C ali boljša.

▼**M1**

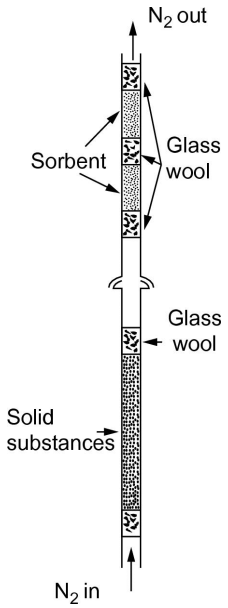
Slika 8



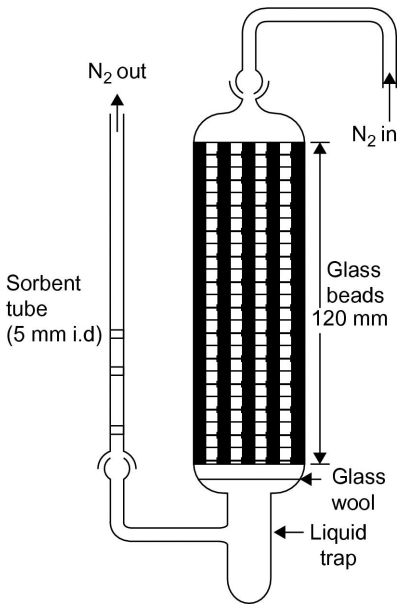
Običajno se za inertni nosilni plin uporablja dušik, občasno pa je treba uporabiti tudi kak drug plin (24). Nosilni plin mora biti suh. Tok plina se razdeli na 6 tokov, ki jih nadzirajo igelni ventili (z odprtino približno 0,79 mm), in teče v posodo po 3,8 mm i.d. bakreni cevi. Po izenačitvi temperature plin teče skozi vzorec in sorbentno past, nato pa zapusti posodo.

Trdni vzorci se namestijo v 5 mm i.d. stekleno cev med čepe iz steklene volne (glej sliko 9). Na sliki 10 sta prikazana naprava za tekoče vzorce in sorbentni sistem. Najbolj ponovljiva metoda za merjenje parnega tlaka tekočin je, da se tekočina nanese na steklene kroglice ali na inerten sorbent, kot je na primer silicijev oksid, nato pa se naprava napolni s temi kroglicami. Alternativno se lahko nosilni plin spelje mimo hrapavega frita in v obliki mehurčkov skozi steber tekoče preskusne snovi.

Slika 9



Slika 10



▼M1

Sorbentni sistem ima sprednji in pomožni sorbentni del. Pri zelo nizkih parnih tlakih sorbent zadrži le majhne količine, zato lahko adsorpcija na stekleni volni in steklenih ceveh med vzorcem in sorbentom povzroča velike težave.

Pasti, ohlajene s trdnim CO_2, so še en učinkovit način za zbiranje uparjenega materiala. Ne povzročajo protitlaka na saturacijsko kolono, prav tako pa je mogoče zelo enostavno kvantitativno odstraniti ujeti material.

1.5.7.3 *Postopek*

Pretok iztočnega nosilnega plina se meri pri sobni temperaturi. Pretok se med preskusom pogosto preverja, da se zagotovi pravilna vrednost za skupno prostornino nosilnega plina. Zaželeno je spremljanje ves čas z merilnikom masnega pretoka. Nasičenje plinske faze lahko zahteva dolg čas stika in zato precej nizke hitrosti pretoka plina (25).

Ob koncu poskusa se sprednji in pomožni sorbentni del analizirata ločeno. Snov v vsakem delu se desorbira s topilom. Nastali raztopini se kvantitativno analizirata, da se določi teža desorpcije vsakega dela. Izbira analitične metode (prav tako tudi izbira sorbenta in desorbentne raztopine) je odvisna od vrste preskusnega materiala. Učinkovitost desorpcije se določi tako, da se znana količina vzorca injicira na sorbent, desorbira, nato pa analizira preostala količina. Pomembno je, da se preskusi učinkovitost desorpcije pri (ali blizu) koncentraciji vzorca pod preskusnimi pogoji.

Da se zagotovi nasičenost nosilnega plina s preskusno snovjo, se uporabijo tri različne hitrosti pretoka plina. Če izračunani parni tlak ne kaže odvisnosti od pretoka, se predpostavlja, da je nasičen.

Parni tlak se izračuna po enačbi:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

pri čemer je:

p = parni tlak (Pa)

W = masa uparjene preskusne snovi (g)

V = volumen nasičenega plina (m^3)

R = splošna plinska konstanta 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = molska masa preskusne snovi (g mol^{-1})

Izmerjene volumne je treba popraviti glede na razlike v tlaku in temperaturi med merilnikom pretoka in saturatorjem.

▼M1

1.5.8 **Rotorska metoda**

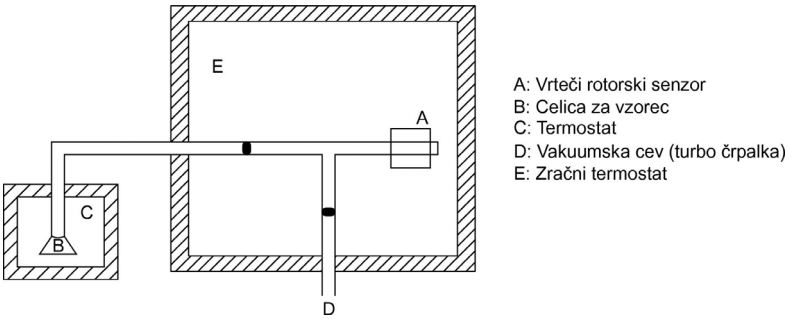
1.5.8.1 *Princip*

Pri tej metodi se uporablja merilnik viskoznosti z rotorjem, v katerem je merilni element jeklena kroglica, postavljena v magnetno polje, tako da lebdi, njeno vrtenje pa povzročajo rotirajoča polja tuljave (26)(27)(28). Merjenje hitrosti njenega vrtenja omogočajo sprejemne tuljave. Ko kroglica doseže določeno hitrost vrtenja, običajno približno 400 vrtljajev na sekundo, se ustavi dotok energije in zaradi trenja, ki ga povzroča plin, se vrtenje upočasni. Padec vrtilne hitrosti se meri kot funkcija časa. Parni tlak se izpelje iz padca hitrosti kroglice, ki je posledica tlaka. Priporočeno območje je od 10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5.8.2 *Aparatura*

Shema postavitve preskusa je prikazana na sliki 11. Merilnik se postavi v posodo s konstantno temperaturo, ki se uravnava na 0,1 °C natančno. Posoda z vzorcem se postavi v ločeno posodo, ki se tudi uravnava na 0,1 °C natančno. Vsi ostali deli sestava pa se vzdržujejo pri višji temperaturi, da se prepreči kondenzacija. Celotna aparatura je priključena na visokovakuumski sistem.

Slika 11



2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 PODATKI

Pri kateri koli od navedenih metod je treba parni tlak določiti pri najmanj dveh temperaturah. Za preverjanje linearnosti krivulje parnega tlaka so zaželene najmanj tri temperature v območju od 0 do 50 °C. Pri efuzijski metodi (Knudsenova celica in izotermična termogravimetrija) in metodi z nasičenjem plina se priporoča temperaturno območje od 120 do 150 °C, namesto od 0 do 50 °C.

2.2 POROČANJE

V poročilo o preskusu se vključijo naslednje informacije:

— uporabljena metoda,

▼M1

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistoče) in predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno,

— najmanj po dve vrednosti parnega tlaka in temperature, če je mogoče, pa tri ali več, v območju 0 do 50 °C (ali od 120 do 150 °C),

— vsaj ena od temperatur mora biti 25 °C ali manj, če je tehnično izvedljivo v skladu z izbrano metodo,

— vsi neobdelani podatki,

— krivulja log p v odvisnosti od 1/T,

— ocenjeni parni tlak pri 20 ali 25 °C.

Če pride do prehoda (spremembe stanja, razpada), je treba navesti naslednje podatke:

— vrsta spremembe,

— temperatura, pri kateri pride do spremembe pri atmosferskem tlaku,

— parni tlak pri 10 in 20 °C pod temperaturo prehoda in pri 10 in 20 °C nad to temperaturo (razen če gre za prehod iz trdnega v plinasto agregatno stanje).

Navesti je treba vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

3. **VIRI**

(1) *Uradni list Evropskih skupnosti*, L 383 A, 26–47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., in Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

(6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use –Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521–532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000)

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22–28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269–278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117–122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137–147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393–400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161–168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27–31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300–310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512–20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., in Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., in Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Dodatek

Ocenjevalna metoda

UVOD

Izračunane vrednosti parnega tlaka se lahko uporabijo:

— za izbiro primerne preskusne metode,

— za pridobitev ocene ali mejne vrednosti v primerih, kadar preskusne metode ni mogoče uporabiti zaradi tehničnih razlogov.

OCENJEVALNA METODA

Parni tlak tekočin in trdnih snovi se lahko oceni z uporabo prilagojene Watsonove korelacije (a). Edini potrebni s preskusom pridobljeni podatek je normalno vrelišče. Metoda je uporabna za območje tlaka od 10^5 Pa do 10^{-5} Pa.

Podrobne informacije o metodi so navedene v „Priročniku metod za ocenjevanje kemijskih lastnosti“ (b). Glej tudi OECD Environmental Monograph št. 67 (c).

RAČUNSKI POSTOPEK

Parni tlak se izračuna na naslednji način:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

pri čemer je:

T = izbrana temperatura

T_b = normalno vrelišče

P_{vp} = parni tlak pri temperaturi T

ΔH_{vb} = izparilna toplota

ΔZ_b = faktor stisljivosti (ocenjen na 0,97)

m = empirični faktor, odvisen od agregatnega stanja pri izbrani temperaturi

Nadalje

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\ (8{,}75 + R \ln T_b)$$

pri čemer je K_F empirični faktor, ki upošteva polarnost snovi. V viru (b) so navedeni faktorji K_F za več spojin.

▼**M1**

Precej pogosto so na voljo podatki o vrelišču pri znižanem tlaku. Pri takih primerih se parni tlak izračuna na naslednji način:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

pri čemer je T_1 vrelišče pri znižanem tlaku P_1.

POROČILO

Pri uporabi ocenjevalne metode, poročilo vključuje izčrpno dokumentacijo izračuna.

VIRI

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5 POVRŠINSKA NAPETOST

1. METODA

Opisane metode temeljijo na smernici za preskušanje OECD (1). Temeljna načela so navedena v viru (2).

1.1 UVOD

Opisane metode se uporabljajo za merjenje površinske napetosti vodnih raztopin.

Pred izvajanjem teh preskusov je koristno imeti predhodne informacije o topnosti snovi v vodi, njeni zgradbi, hidrolitskih lastnostih in kritični koncentraciji za tvorbo micel.

Metode, ki sledijo, so uporabne za večino kemijskih snovi, brez kakršnih koli omejitev glede njihove stopnje čistosti.

Merjenje površinske napetosti z metodo tenziometra z obročkom je omejeno na vodne raztopine z dinamično viskoznostjo pod približno 200 mPa s.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Prosto površinsko entalpijo na enoto površine imenujemo površinska napetost.

Površinska napetost se navede v:

N/m (enota SI) ali

mN/m (podenota SI)

$1\ N/m = 10^3\ din/cm$

1 mN/m = 1 din/cm v zastarelem sistemu cgs

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Referenčne snovi, ki zajemajo široko območje površinskih napetosti, so navedene v virih 1 in 3.

1.4 PRINCIP METOD

Metode temeljijo na merjenju največje navpične sile, ki jo je treba uporabiti na zanki ali obročku v stiku s površino preiskovane tekočine v merilni posodici, da bi ga ločili od te površine, ali na ploščici, katere rob se stika s površino, da bi potegnili nastali film navzgor.

Snovi, ki so topne v vodi vsaj pri koncentraciji 1 mg/l, se preskušajo v vodni raztopini pri eni sami koncentraciji.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Natančnost teh metod je večja, kot je to običajno potrebno za okoljsko presojo.

▼B

1.6 OPIS METOD

Pripravi se raztopina snovi v destilirani vodi. Koncentracija te raztopine mora biti 90 % koncentracije nasičene raztopine te snovi v vodi; kadar ta koncentracija presega 1 g/l, se za preskušanje uporabi koncentracija 1 g/l. Snovi, katerih topnost v vodi je manjša od 1 mg/l, ni treba preskušati.

1.6.1 **Metoda s ploščico**

Glej ISO 304 in NF T 73-060 (Površinsko aktivne snovi – določanje površinske napetosti z dviganjem tekočinskih filmov).

1.6.2 **Metoda z zanko**

Glej ISO 304 in NF T 73-060 (Površinsko aktivne snovi – določanje površinske napetosti z dviganjem tekočinskih filmov).

1.6.3 **Metoda z obročkom**

Glej ISO 304 in NF T 73-060 (Površinsko aktivne snovi – določanje površinske napetosti z dviganjem tekočinskih filmov).

1.6.4 **Usklajena metoda OECD z obročkom**

1.6.4.1 *Aparatura*

Za to merjenje so primerni na trgu dostopni tenziometri. Sestavljajo jih naslednji deli:

— premična mizica za vzorec,

— sistem za merjenje sile,

— merilno telo (obroček),

— merilna posoda.

1.6.4.1.1 Premična mizica za vzorec

Premična mizica za vzorec se uporablja kot podpora za termostatirano merilno posodo, v kateri je preskusna tekočina. Skupaj s sistemom za merjenje sile je nameščena na stojalu.

1.6.4.1.2 Sistem za merjenje sile

Sistem za merjenje sile (glej sliko) je nad mizico za vzorec. Napaka pri merjenju sile ne sme presegati ± 10^{-6} N, kar ustreza meji napake ± 0,1 mg pri določanju mase. Merilna skala na trgu dostopnih tenziometrov je v večini primerov umerjena v mN/m, tako da se lahko površinska napetost odčita neposredno v mN/m na 0,1 mN/m točno.

▼B

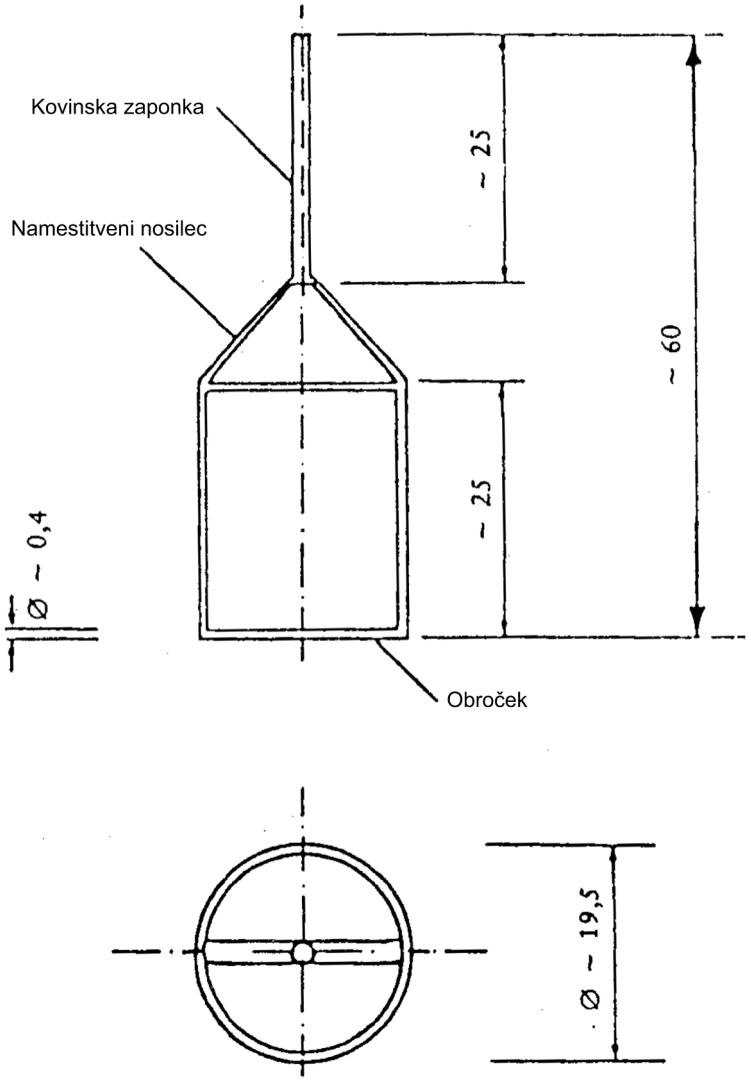
1.6.4.1.3 Merilno telo (obroček)

Obroček je običajno narejen iz platina-iridijeve žice, debele približno 0,4 mm, in s povprečnim obsegom 60 mm. Žičnati obroček visi v vodoravnem položaju s kovinske zaponke in žičnatega namestitvenega nosilca, tako da je povezan s sistemom za merjenje sile (glej sliko).

Slika

Merilno telo

(Vse dimenzije so v milimetrih)



1.6.4.1.4 Merilna posoda

Merilna posoda, v kateri je preskusna raztopina, je termostatirana steklena posoda. Zasnovana je tako, da med merjenjem temperatura preskusne raztopine in plinske faze nad njeno površino ostane konstantna ter vzorec ne more izhlapeti. Sprejemljive so valjaste steklene posode z notranjim premerom najmanj 45 mm.

▼B

1.6.4.2 *Priprava aparature*

1.6.4.2.1 Č i š č e n j e

Steklene posode se temeljito očistijo. Če je potrebno, se operejo z vročo kromžveplovo kislino in nato z gosto tekočo fosforjevo kislino (83 do 98 masnih % H_3PO_4), temeljito sperejo pod tekočo vodo in nazadnje še z dvakrat destilirano vodo do nevtralne reakcije, nato se posušijoali splaknejo z delom preskusne tekočine.

Obroček se najprej temeljito splakne z vodo, da se odstranijo vse v vodi topne snovi, nato se za kratek čas potopi v kromžveplovo kislino, opere v dvakrat destilirani vodi do nevtralne reakcije ter na koncu na hitro segreje nad metanolnim plamenom.

Opomba:

Nečistote, ki niso topne ali razgradljive v kromžveplovi ali fosforjevi kislini, na primer silikoni, se odstranijo z ustreznim organskim topilom.

1.6.4.2.2 U m e r j a n j e a p a r a t u r e

Validacija aparature obsega preverjanje ničelne točke in njeno naravnavo, tako da je omogočeno zanesljivo odčitavanje z instrumenta v mN/m.

Postavitev:

Aparatura se izravna, na primer s pomočjo vodne tehtnice na osnovni plošči tenziometra, z nastavitvijo izravnalnih vijakov na osnovni plošči.

Naravnava ničelne točke:

Po namestitvi obročka na aparaturo in pred potopitvijo v tekočino se tenziometer naravna na ničlo ter preveri, ali je obroček vzporeden s površino tekočine. V ta namen se površina tekočine lahko uporabi kot ogledalo.

Umeritev:

Dejansko umerjanje se lahko opravi po enem od dveh postopkov:

(a) Z uporabo mase: postopek z uporabo jahačev z znano maso med 0,1 in 1,0 g, postavljenih na obroček. Umeritveni faktor Φ_a, s katerim je treba pomnožiti vse odčitke z instrumenta, se določi po enačbi (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

pri čemer je:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masa jahača (g)

g = gravitacijski pospešek (981 cm s^{-2} na morski višini)

b = povprečni obseg obročka (cm)

σa = odčitek tenziometra po namestitvi jahača na obroček (mN/m).

▼B

(b) Z uporabo vode: postopek z uporabo čiste vode, katere površinska napetost pri, na primer, 23 °C je 72,3 mN/m. Ta postopek je hitrejši od masnega umerjanja, vendar vedno obstaja nevarnost, da je površinska napetost vode napačna zaradi sledov onesnaženja s površinsko aktivnimi snovmi.

Umeritveni faktor Φ_b, s katerim je treba pomnožiti vse odčitke z instrumenta, se določi po enačbi (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

pri čemer je:

σ_o = površinska napetost vode, navedena v literaturi (mN/m)

σ_g = izmerjena površinska napetost vode (mN/m), obe pri isti temperaturi.

1.6.4.3 *Priprava vzorcev*

Pripravijo se vodne raztopine preskusnih snovi v potrebnih koncentracijah in ne smejo vsebovati nobenih neraztopljenih snovi.

Vzdrževati je treba konstantno temperaturo (± 0,5 °C) raztopine. Ker se površinska napetost raztopine v merilni posodi spreminja s časom, se izvede več meritev ob različnih časih in izdela krivulja, ki prikazuje površinsko napetost kot funkcijo časa. Ko ni več nadaljnjih sprememb, je doseženo stanje ravnotežja.

Onesnaženje z drugimi snovmi v obliki prahu in plinov moti merjenje. Zato se delo izvaja pod zaščitnim pokrovom.

1.6.5 **Preskusni pogoji**

Merjenje se opravi pri približno 20 °C, ob vzdrževanju konstantne temperature ± 0,5 °C.

1.6.6 **Izvedba preskusa**

Merjena raztopina se nalije v dobro očiščeno merilno posodo, pri čemer je treba paziti, da se ne peni, nato se merilna posoda postavi na mizico preskusne aparature. Vrh mizice z merilno posodo se dviga, dokler se obroček ne potopi pod površino merjene raztopine. Nato se vrh mizice postopoma in enakomerno spušča (s hitrostjo približno 0,5 cm/min), da bi se obroček odtrgal od površine, dokler se ne doseže največja sila. Tekoča plast, ki se drži obročka, se od njega ne sme ločiti. Po končani meritvi se obroček spet potopi pod površino in merjenja ponavljajo, dokler se ne doseže konstantna vrednost površinske napetosti. Za vsako meritev se zapiše čas, ki je minil od ulitja tekočine v merilno posodo. Vrednost se odčita pri največji sili, potrebni za odtrganje obročka od površine tekočine.

▼B

2. **PODATKI**

Za izračun površinske napetosti se vrednost, odčitana z aparature v mN/m, najprej pomnoži z umeritvenim faktorjem Φ_a ali Φ_b (odvisno od uporabljenega umeritvenega postopka). Dobljena vrednost je le približna in jo je treba popraviti.

Harkins in Jordan (4) sta empirično določila korekcijske faktorje za vrednosti površinske napetosti, izmerjene z metodo z obročkom, ki so odvisni od dimenzij obročka, gostote tekočine in njene površinske napetosti.

Ker je postopek določanja korekcijskega faktorja za vsako posamezno meritev iz Harkinsovih in Jordanovih tabel dolgotrajen, se lahko za izračun površinske napetosti vodnih raztopin uporabi poenostavljeni postopek odčitavanja popravljenih vrednosti površinskih napetosti neposredno iz tabele. (Za odčitke med vrednostmi v tabeli se uporabi interpolacija.)

Tabela

Popravljanje izmerjene površinske napetosti

Le za vodne raztopine, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (povprečni polmer obročka)
r	= 0,185 mm (polmer žice obročka)

Izmerjena vrednost (mN/m)	Popravljena vrednost (mN/m)	
	Umeritev z maso (glej 1.6.4.2.2(a))	Umertlev z vodo (glej 1.6.4.2.2(b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Izmerjena vrednost (mN/m)	Popravljena vrednost (mN/m)	
	Umeritev z maso (glej 1.6.4.2.2(a))	Umertlev z vodo (glej 1.6.4.2.2(b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Ta tabela je bila sestavljena na podlagi Harkins-Jordanovega popravka. Podobna je tabeli iz standarda DIN (DIN 53914) za vodo in vodne raztopine (gostota ρ = 1 g/cm^3) in velja za na trgu dostopen obroček z dimenzijami R = 9,55 mm (povprečni polmer obročka) in r = 0,185 mm (polmer žice obročka). V tabeli so popravljene vrednosti za meritve površinske napetosti, opravljene po umeritvi z utežmi ali vodo.

Druga možnost je, da se brez predhodne umeritve površinska napetost izračuna po naslednji enačbi:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

pri čemer je:

F = sila, izmerjena z dinamometrom, tik preden film poči

R = polmer obročka

f = korekcijski faktor (1)

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— uporabljena metoda,

— vrsta uporabljene vode ali raztopine,

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— rezultati merjenja: površinska napetost (odčitek), tako posamezni odčitki kot tudi njihova aritmetična sredina in popravljena aritmetična sredina (upoštevajoč faktor opreme in korekcijsko tabelo),

▼B

— koncentracija raztopine,

— temperatura preskusa,

— starost uporabljene raztopine; zlasti čas, pretekel od priprave do meritve raztopine,

— opis časovne odvisnosti površinske napetosti po prenosu raztopine v merilno posodo,

— informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

3.2 RAZLAGA REZULTATOV

Glede na to, da je površinska napetost destilirane vode 72,75 mN/m pri 20 °C, je treba snovi, katerih površinska napetost pri pogojih te metode je manjša od 60 mN/m, šteti za površinsko aktivne snovi.

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6 **TOPNOST V VODI**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 105 (1995). Je revidirana različica prvotne TG 105, ki je bila sprejeta leta 1981. Med sedanjo različico in tisto iz leta 1981 ni vsebinskih razlik, temveč je spremenjena predvsem oblika. Revizija je temeljila na preskusni metodi EU „Topnost v vodi“ ([1]).

ZAČETNI PREUDARKI

2. Na topnost snovi v vodi lahko znatno vpliva prisotnost nečistot. S to preskusno metodo se določa topnost v vodi za v glavnem čiste snovi, ki so stabilne v vodi in niso hlapne. Pred določanjem topnosti v vodi je koristno imeti nekatere predhodne informacije o preskusni snovi, kot so strukturna formula, parni tlak, disociacijska konstanta in hidroliza v odvisnosti od pH.

3. V tej preskusni metodi sta opisani dve metodi, in sicer metoda z izpiranjem kolone in metoda z bučko, ki se uporabljata za topnost pod 10^{-2} g/l oziroma nad njo. Opisan je tudi preprost predhodni preskus. Ta omogoča določitev približne količine vzorca, ki bo uporabljena v končnem preskusu, in časa, potrebnega za dosego nasičenja.

OPREDELITEV POJMOV IN ENOTE

4. Topnost snovi v vodi je masna koncentracija nasičene raztopine te snovi v vodi pri določeni temperaturi.

5. Topnost v vodi je izražena v masi topljenca na volumen raztopine. Enota SI je kg/m^3, lahko pa se uporablja tudi g/l.

REFERENČNE KEMIKALIJE

6. Pri preiskovanju preskusne snovi ni treba uporabiti referenčnih kemikalij.

OPIS METOD

Preskusni pogoji

7. Preskus se po možnosti opravi pri 20 ± 0,5 °C. Izbrana temperatura mora biti konstantna v vseh bistvenih delih opreme.

Predhodni preskus

8. Približno 0,1 g vzorca (trdne preskusne snovi je treba upršiti) v 10-mililitrskem merilnem valju s steklenim zamaškom se postopno dodajajo vse večje količine vode sobne temperature. Po vsakem dodatku določene količine vode se zmes 10 minut stresa, nato pa se vizualno preveri, ali so v njej prisotni neraztopljeni delci vzorca. Če po dodanih 10 ml vode vzorec ali del vzorca ostane neraztopljen, se preskus nadaljuje v 100-mililitrskem merilnem valju. Približna topnost je navedena v preglednici 1 pod tisto količino vode, v

▼M4

kateri se je vzorec popolnoma raztopil. Kadar je topnost nizka, je lahko za raztopitev preskusne snovi potrebnega veliko časa, počakati pa je treba najmanj 24 ur. Če preskusna snov po 24 urah še vedno ni raztopljena, je treba počakati dlje (do 96 ur) ali jo dodatno razredčiti, da se ugotovi, ali je treba uporabiti metodo z izpiranjem kolone ali metodo z bučko.

Preglednica 1

ml vode za 0,1 g topne snovi	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
približna topnost v g/l	> 1 000	1 000 do 200	200 do 100	100 do 50	50 do 10	10 do 1	< 1

Metoda z izpiranjem kolone

Načelo

9. Ta metoda temelji na izpiranju preskusne snovi z vodo iz mikrokolone, ki je napolnjena z inertnim nosilcem, na katerega se predhodno nanese prebitna količina preskusne snovi (2). Topnost v vodi se določi, ko masna koncentracija eluata doseže konstantno raven v odvisnosti od časa.

Aparatura

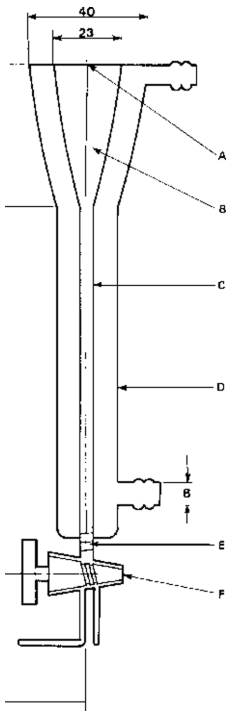
10. Aparaturo sestavlja mikrokolona (slika 1), v kateri se ohranja konstantna temperatura in ki je povezana bodisi z recirkulacijsko črpalko (slika 2) bodisi z nivojsko posodo (slika 3). Mikrokolona vsebuje inertni nosilec, katerega uhajanje preprečuje majhen čep iz steklene volne, ki se uporablja tudi za filtracijo delcev. Kot nosilec je mogoče uporabiti steklene kroglice, diatomejsko zemljo ali druge inertne materiale.

11. Mikrokolona na sliki 1 je primerna za postavitev z recirkulacijsko črpalko. Ima nadprostor s petkratnim volumnom polnitve (pet volumnov polnitve se na začetku preskusa zavrže) in volumen petih vzorcev (ki se med preskusom vzamejo za analizo). Lahko je tudi manjša, če je mogoče v sistem med preskusom dodajati vodo za nadomestitev začetnih petih volumnov polnitve, ki se zavržejo skupaj z nečistotami. Kolona je s cevjo iz inertnega materiala povezana z recirkulacijsko črpalko z zmogljivostjo približno 25 ml/h. Recirkulacijska črpalka je lahko na primer peristaltična ali membranska črpalka. Paziti je treba, da material cevi ne povzroči onesnaženja in/ali adsorpcije.

12. Shema postavitve z nivojsko posodo je prikazana na sliki 3. Pri tej postavitvi je mikrokolona opremljena z enosmernim petelinčkom. Povezavo z nivojsko posodo sestavljata spojka iz brušenega stekla in cev iz inertnega materiala. Pretok iz nivojske posode mora biti približno 25 ml/h.

▼**M4**

Slika 1



Mere v mm

A. Priključek za spojko iz brušenega stekla

B. Nadprostor

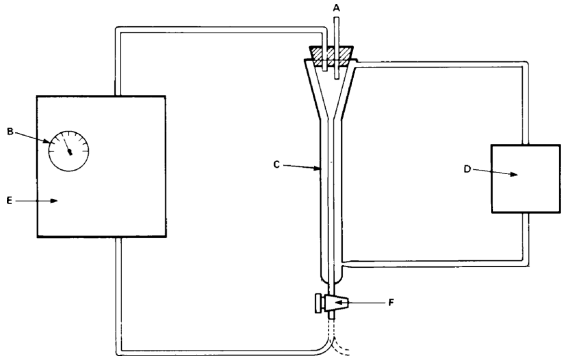
C. Notranjost 5

D. Zunanjost 19

E. Čep iz steklene volne

F. Petelinček

Slika 2



A. Atmosfersko uravnoteževanje

B. Merilnik pretoka

C. Mikrokolona

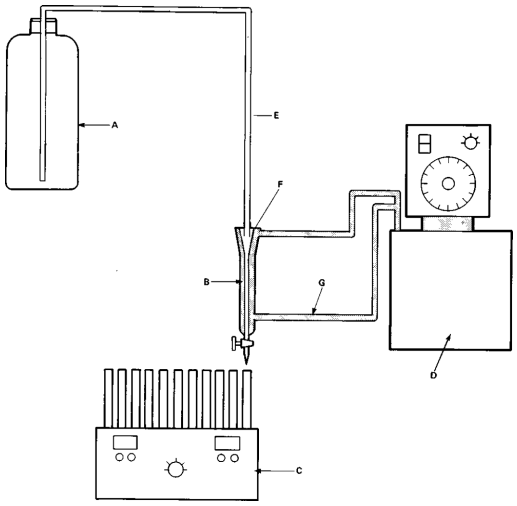
D. Termostatirana cirkulacijska črpalka

E. Recirkulacijska črpalka

F. Dvosmerni ventil za vzorčenje

▼**M4**

Slika 3



A. Nivojska posoda (npr. 2,5-litrska laboratorijska steklenica)

B. Kolona

C. Zbiralnik frakcij

D. Termostat

E. Teflonska cev

F. Spojka iz brušenega stekla

G. Dovod vode (med termostatom in kolono, notranji premer: približno 8 mm)

13. Približno 600 mg nosilca se prenese v 50-mililitrsko bučko z okroglim dnom. Primerna količina preskusne snovi se raztopi v analitsko čistem hlapnem topilu, nato pa se ustrezna količina te raztopine doda nosilcu. Topilo se popolnoma upari, npr. z rotacijskim uparjalnikom, sicer se nosilec med izpiranjem ne bo nasitil z vodo zaradi porazdelitve na površini. Nosilec z naneseno preskusno snovjo se dve uri namaka v približno 5 ml vode, nato pa se suspenzija prelije v mikrokolono. Druga možnost je, da se v mikrokolono, napolnjeno z vodo, strese suh nosilec z naneseno preskusno snovjo in se nato pusti približno dve uri, da se vzpostavi ravnotežje.

14. Nanašanje na nosilec lahko povzroči težave, ki lahko privedejo do napačnih rezultatov, npr. če se preskusna snov poseda kot olje. Take težave je treba preučiti in o tem poročati.

Postopek z recirkulacijsko črpalko

15. Tok se požene skozi kolono. Priporočljivo je, da se uporabi pretok približno 25 ml/h, ki ustreza 10 volumnom polnitve na uro za opisano kolono. Najmanj prvih pet volumnov polnitve se zavrže, da se odstranijo v vodi topne nečistote. Zatem naj črpalka deluje do vzpostavitve ravnotežja, ki je opredeljeno s petimi zaporednimi vzorci, katerih koncentracije se med seboj ne razlikujejo za več kot ± 30 %. Časovni intervali med temi vzorci morajo ustrezati prehodu najmanj deset volumnov polnitve. Glede na uporabljeno analitsko metodo je morda priporočljivo izdelati krivuljo koncentracija-čas, ki prikazuje vzpostavitev ravnotežja.

▼M4

Postopek z nivojsko posodo

16. Zaporedne frakcije eluata se zberejo in analizirajo z izbrano metodo. Za določitev topnosti se uporabijo frakcije eluata iz srednjega območja, kjer so koncentracije pri najmanj petih zaporednih frakcijah konstantne v območju ± 30 %.

17. Najprimernejši eluent je dvakrat destilirana voda. Uporabi se lahko tudi deionizirana voda z upornostjo nad 10 megaomov/cm, in vsebnostjo organskega ogljika pod 0,01 %.

18. Pri obeh postopkih se druga meritev opravi pri polovičnem pretoku prve meritve. Če so rezultati obeh meritev skladni, je preskus zadovoljiv. Če je pri manjšem pretoku izmerjena topnost večja, je treba pretok razpolavljati, dokler ni topnost pri dveh zaporednih meritvah enaka.

19. Pri obeh postopkih je treba s preverjanjem Tyndallovega efekta preveriti, ali frakcije vsebujejo koloidne delce. Ob prisotnosti delcev je treba preskus razveljaviti in ga ponoviti, ko se izboljša filtracija v koloni.

20. Izmeriti je treba pH vsakega vzorca, po možnosti s posebnimi merilnimi lističi.

Metoda z bučko

Načelo

21. Preskusna snov (trdne snovi je treba uprašiti) se raztopi v vodi pri temperaturi, ki je nekoliko višja od temperature preskusa. Ko se doseže nasičenost, se zmes ohladi in ohranja na temperaturi preskusa. Meritev se lahko izvede tudi neposredno pri temperaturi preskusa, če se z ustreznim vzorčenjem zagotovi, da je dosežena točka nasičenja. Nato se z ustrezno analitsko metodo (3) določi masna koncentracija preskusne snovi v vodni raztopini, ki ne sme vsebovati neraztopljenih delcev.

Aparatura

22. Potrebna je naslednja oprema:

— običajna laboratorijska steklovina in instrumentarij,

— naprava za stresanje ali mešanje raztopin pri nadzorovani konstantni temperaturi,

— če je potrebna za emulzije, centrifuga (po možnosti termostatirana) in

— analitska oprema.

Postopek

23. S predhodnim preskusom se oceni količina preskusne snovi, potrebna za nasičenje želenega volumna vode. Približno petkratnik te količine se zatehta v vsako od treh steklenih posod s steklenimi zamaški (npr. centrifugirke, bučke). V vsako posodo se doda volumen vode, izbran glede na analitsko metodo in območje topnosti. Posode se tesno zamašijo in pretresejo pri 30 °C. Uporabiti je treba napravo za stresanje ali mešanje, ki lahko deluje pri konstantni temperaturi, npr. napravo za magnetno mešanje v termostatirani vodni kopeli. Po enem dnevu se v eni od posod 24 ur vzpostavlja ravnotežje pri temperaturi preskusa, pri čemer se posoda občasno pretrese. Vsebina posode se pri temperaturi preskusa centrifugira, nato pa se z ustrezno analitsko metodo določi koncentracija preskusne snovi v bistri

▼M4

vodni fazi. S preostalima posodama se ravna podobno po začetnem vzpostavljanju ravnotežja pri 30 °C, ki traja pri eni dva in pri drugi tri dni. Če se izmerjene koncentracije v vsaj zadnjih dveh posodah ne razlikujejo za več kot 15 %, je preskus zadovoljiv. Če se pri rezultatih, izmerjenih v posodah 1, 2 in 3, kaže težnja k naraščanju vrednosti, je treba celoten preskus ponoviti z daljšimi časi za vzpostavljanje ravnotežja.

24. Preskus se lahko opravi tudi brez predhodne inkubacije pri 30 °C. Da se oceni hitrost doseganja točke nasičenja, se vzorci jemljejo, dokler čas mešanja ne vpliva več na izmerjene koncentracije.

25. Izmeriti je treba pH vsakega vzorca, po možnosti s posebnimi merilnimi lističi.

Analitsko določanje

26. Po možnosti se uporabi metoda, specifična za posamezno snov, saj lahko majhne količine topnih nečistot povzročijo velike napake pri izmerjeni topnosti. Primeri takih metod so: plinska ali tekočinska kromatografija, titracija, fotometrija, voltametrija.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

Metoda z izpiranjem kolone

27. Za vsako ponovitev je treba izračunati srednjo vrednost in standardni odklon za najmanj pet zaporednih vzorcev, vzetih pri točki nasičenja. Srednje vrednosti, dobljene pri dveh preskusih z različnimi pretoki, se ne smejo razlikovati za več kot 30 %.

Metoda z bučko

28. Za vsako od treh bučk se izračuna povprečna vrednost rezultatov, ki se ne smejo razlikovati za več kot 15 %.

Poročilo o preskusu

Metoda z izpiranjem kolone

29. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

— rezultate predhodnega preskusa,

— kemijsko identiteto in nečistote (predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno),

— koncentracije, pretoke in pH za vsak vzorec,

— srednje vrednosti in standardne odklone za najmanj pet vzorcev, vzetih pri točki nasičenja vsake ponovitve,

— povprečje najmanj dveh zaporednih ponovitev,

— temperaturo vode med procesom nasičenja,

— analitsko metodo,

— vrsto nosilca,

— nanašanje na nosilec,

— uporabljeno topilo,

— dokaze o kakršni koli kemijski nestabilnosti snovi med preskusom,

— vse informacije, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja preskusne snovi.

▼**M4**

Metoda z bučko

30. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

— rezultate predhodnega preskusa,

— kemijsko identiteto in nečistote (predhodno prečiščevanje, če je bilo opravljeno),

— posamezne analitske določitve in povprečje, če je bilo za posamezno bučko določenih več vrednosti,

— pH vsakega vzorca,

— povprečje vrednosti za različne bučke, pri katerih so bili rezultati skladni,

— temperaturo preskusa,

— analitsko metodo,

— dokaze o kakršni koli kemijski nestabilnosti snovi med preskusom,

— vse informacije, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja preskusne snovi.

VIRI:

(1) Direktiva Komisije 92/69/EGS z dne 31. julija 1992 o sedemnajsti prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi (UL L 383, 29.12.1992, str. 54).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (september 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (september 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8 PORAZDELITVENI KOEFICIENT

1. METODA

Opisana metoda „stresanja bučke“ temelji na smernici za preskušanje OECD (1).

1.1 UVOD

Za izvajanje tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o strukturni formuli, disociacijski konstanti, topnosti v vodi, hidrolizi, topnosti v n-oktanolu in površinski napetosti snovi.

Pri snoveh, ki tvorijo ione, je treba meritve opraviti le z njihovo neionizirano obliko (prosta kislina ali prosta baza), pridobljeno z uporabo ustreznega pufra s pH, ki je najmanj eno enoto pod (prosta kislina) ali nad (prosta baza) pK.

Ta preskusna metoda vključuje dva ločena postopka: metodo stresanja bučke in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Prvi se uporablja, kadar je vrednost log P_{ow} (opredelitve glej spodaj) v območju od -2 do 4, in drugi, kadar je v območju od 0 do 6. Pred izvedbo katerega koli postopka, je treba pridobiti predhodno oceno porazdelitvenega koeficienta.

Metoda stresanja bučke se uporablja samo za v glavnem čiste snovi, topne v vodi in n-oktanolu. Ni uporabna za površinsko aktivne snovi (za katere je treba navesti izračunano vrednost ali oceno na podlagi topnosti v n-oktanolu in topnosti v vodi).

Metoda HPLC ni uporabna za močne kisline in baze, kovinske komplekse, površinsko aktivne snovi ali snovi, ki reagirajo z eluentom. Za te snovi je treba navesti izračunano vrednost ali oceno na podlagi topnosti v n-oktanolu in topnosti v vodi.

Metoda HPLC je manj občutljiva za prisotnost nečistot v preskusni snovi kakor metoda stresanja bučke. Vendar v nekaterih primerih lahko nečistote otežijo razlago rezultatov, ker postane določitev vrha negotova. Za zmesi, ki dajo nedoločen pas, se navedejo zgornja in spodnja meja log P.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Porazdelitveni koeficient (P) je torej količnik dveh koncentracij in se ponavadi navede v obliki logaritma z osnovo 10 (log P).

$$P_{ow} = \frac{c_{n-Octanol}}{c_{Voda}}$$

Porazdelitveni koeficient (P) je opredeljen kot razmerje ravnotežnih koncentracij (c) raztopljene snovi v dvofaznem sistemu, sestavljenem iz dveh topil, ki se v glavnem ne mešata. V primeru n-oktanola in vode:

▼B

1.3 REFERENČNE SNOVI

Metoda stresanja bučke

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

Metoda HPLC

Za določitev soodvisnosti med rezultati meritev s HPLC za snov in njeno vrednostjo P, je treba izdelati umeritveno krivuljo log P v odvisnosti od kromatografskih podatkov z uporabo najmanj 6 referenčnih točk. Uporabnik sam izbere primerne referenčne snovi. Kadar je le mogoče, naj ima najmanj ena referenčna snov večji in ena manjši P_{ow} kot preskusna snov. Za vrednosti log P, manjše od 4, umeritev lahko temelji na podatkih, dobljenih z metodo stresanja bučke. Za vrednosti log P, večje od 4, umeritev lahko temelji na validiranih podatkih iz literature, če so skladni z izračunanimi vrednostmi. Za večjo točnost je priporočljivo izbrati referenčne snovi, ki so strukturno sorodne preskusni snovi.

Na voljo so izčrpni seznami vrednosti log P_{ow} za mnoge skupine kemikalij (2)(3). Če ni podatkov o porazdelitvenih koeficientih strukturno sorodnih snovi, se lahko uporabi bolj splošna umeritev z drugimi referenčnimi snovmi.

Seznam priporočenih referenčnih snovi in njihovih vrednosti P_{ow} je v dodatku 2.

1.4 PRINCIP METODE

1.4.1 **Metoda stresanja bučke**

Za določitev porazdelitvenega koeficienta je treba vzpostaviti ravnotežje med vsemi medsebojno delujočimi komponentami sistema in določiti koncentraciji snovi, raztopljene v dveh fazah. Študija literature o tej temi kaže, da se v ta namen lahko uporabi več različnih tehnik, npr. temeljito mešanje dveh faz, ki mu sledi njuno ločevanje, da se ugotovi ravnotežna koncentracija preiskovane snovi.

1.4.2 **Metoda HPLC**

HPLC se izvaja z analitskimi kolonami, napolnjenimi z na trgu dostopno trdno fazo, ki vsebuje dolge verige ogljikovodikov (npr. C_8, C_{18}), vezane na silicijev dioksid. Snovi, injicirane v tako kolono, potujejo vzdolž nje z različnimi hitrostmi, zaradi različne stopnje porazdelitve med mobilno fazo in stacionarno fazo ogljikovodikov. Zmesi snovi se eluirajo v vrstnem redu po hidrofobnosti, pri čemer se prve eluirajo vodotopne snovi in zadnje tiste, topne v olju, sorazmerno z njihovim porazdelitvenim koeficientom ogljikovodik/voda. To omogoča določitev razmerja med retenzijskim časom v taki koloni (z reverzno fazo) in porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda. Porazdelitveni koeficient se določi s sklepanjem iz faktorja kapacitete k, opisanega z enačbo: molekula topila, da pride skozi kolono (mrtvi čas).

▼B

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

pri čemer je t_R = retenzijski čas preskusne snovi in t_o = povprečni čas, ki ga potrebuje molekula topila, da pride skozi kolono (mrtvi čas).

Kvantitativna analiza ni potrebna, treba je določiti le elucijske čase.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

1.5.1 **Ponovljivost**

Metoda stresanja bučke

Da se zagotovi točnost porazdelitvenega koeficienta, je treba izvesti po dve vzporedni meritvi pri treh različnih preskusnih pogojih, pri čemer se lahko spreminjata količina navedene snovi in razmerje volumnov topil. Določene vrednosti porazdelitvenega koeficienta, izražene kot logaritmi z osnovo 10, morajo biti v območju ± 0,3 log enot.

Metoda HPLC

Za povečanje zanesljivosti meritve, je treba izvesti dve vzporedni določitvi. Vrednosti log P, izpeljane iz posameznih meritev, naj bodo v območju ± 0,1 enot log.

1.5.2 **Občutljivost**

Metoda stresanja bučke

Merilno območje metode je določeno z mejo detekcije analitskega postopka. Ta bi morala omogočiti določitev vrednosti log P_{ow} v območju od –2 do 4 (občasno, kadar so izpolnjeni pogoji, se to območje lahko razširi do vrednosti log P_{ow} 5), kadar koncentracija topljenca v nobeni fazi ni večja od 0,01 mola na liter.

Metoda HPLC

Metoda HPLC omogoča ocenjevanje porazdelitvenega koeficienta v območju log P_{ow} od 0 do 6.

Navadno se porazdelitveni koeficient lahko oceni do ± 1 enote log vrednosti, dobljene z metodo stresanja bučke. Značilne soodvisnosti so navedene v literaturi (4)(5)(6)(7)(8). Običajno se lahko doseže večja točnost, kadar korelacijske krivulje temeljijo na strukturno sorodnih referenčnih snoveh (9).

▼B

1.5.3 **Specifičnost**

Metoda stresanja bučke

Nernstov porazdelitveni zakon velja samo pri konstantnih temperaturi, tlaku in pH za razredčene raztopine. Nanaša se le na čiste snovi, porazdeljene med dve čisti topili. Če se v eni ali obeh fazah istočasno pojavi več različnih topljencev, lahko to vpliva na rezultate.

Disociacija ali asociacija raztopljenih molekul lahko povzroči odstopanje od Nernstovega porazdelitvenega zakona. Na takšna odstopanja pokaže dejstvo, da postane porazdelitveni koeficient odvisen od koncentracije raztopine.

Ker ta preskusna metoda zajema več ravnotežij, se ne sme uporabljati za snovi, ki jih je mogoče ionizirati, ne da bi se upošteval popravek. Pri takšnih snoveh je treba presoditi o uporabi pufrskih raztopin namesto vode; pH pufra se mora najmanj za eno enoto pH razlikovati od pKa snovi, pri čemer je treba upoštevati pomen tega pH za okolje.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Predhodna ocena porazdelitvenega koeficienta**

Porazdelitveni koeficient se po možnosti oceni z računsko metodo (glej dodatek 1) ali, kadar je primerno, iz razmerja topnosti preskusne snovi v čistih topilih (10).

1.6.2 **Metoda stresanja bučke**

1.6.2.1 *Priprava*

n-Oktanol: Določitev porazdelitvenega koeficienta je treba opraviti z zelo čistimi analitskimi reagenti.

Voda: treba je uporabiti vodo, destilirano ali dvakrat destilirano v stekleni ali kremenčevi aparaturi. Za snovi, ki jih je mogoče ionizirati, se uporabijo pufri, če je to upravičeno.

Opomba:

Ne sme se uporabiti voda, vzeta neposredno iz ionskega izmenjevalca.

1.6.2.1.1 Predhodno nasičenje topil

Preden se določi porazdelitveni koeficient, se topili medsebojno nasitita s stresanjem pri temperaturi preskusa. To se najlaže izvede tako, da se dve veliki standardni steklenici zelo čistega analitskega n-oktanola ali vode, v vsaki od katerih je zadostna količina drugega topila, stresata 24 ur na mehanskem stresalniku, nato se pustita stati tako dolgo, da se fazi ločita in se vzpostavi stanje nasičenosti.

▼B

1.6.2.1.2 Priprava na preskus

Celoten volumen dvofaznega sistema naj bo tolikšen, da skoraj v celoti napolni preskusno posodo. To bo pomagalo preprečiti izgubo topila zaradi izhlapevanja. Volumsko razmerje in količine snovi, ki se bodo uporabili, se določijo glede na:

— predhodno oceno porazdelitvenega koeficienta (glej zgoraj),

— najmanjšo količino preskusne snovi, potrebno za analitski postopek, in

— omejitvijo največje koncentracije v kateri koli fazi na 0,01 mola na liter.

Opravijo se trije preskusi. Pri prvem se uporabi izračunano volumsko razmerje n-oktanol/voda; pri drugem se to razmerje deli z dve; pri tretjem pa se pomnoži z dve (npr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Preskusna snov

Pripravi se osnovna raztopina v n-oktanolu, predhodno nasičenem z vodo. Preden se ta osnovna raztopina uporabi za določanje porazdelitvenega koeficienta, je treba natančno določiti njeno koncentracijo. Ta raztopina se hrani v pogojih, ki zagotavljajo njeno stabilnost.

1.6.2.2 *Preskusni pogoji*

Temperatura preskusa mora biti konstantna (± 1 °C) in v območju med 20 in 25 °C.

1.6.2.3 *Merilni postopek*

1.6.2.3.1 Vzpostavitev porazdelitvenega ravnotežja

Za vsakega od preskusnih pogojev je treba pripraviti po dve preskusni posodi, ki vsebujeta potrebni, točno odmerjeni količini obeh topil ter potrebno količino osnovne raztopine.

Faze n-oktanola se merijo z volumni. Preskusne posode je treba bodisi namestiti na ustrezne stresalnike ali jih stresati ročno. Kadar se uporabljajo centrifugirke, je priporočena metoda hitro obračanje centrifugirke za 180° okrog njene prečne osi, tako da se morebitni ujeti zrak dvigne skozi obe fazi. Izkušnje so pokazale, da 50 takšnih obratov običajno zadostuje za vzpostavitev porazdelitvenega ravnotežja. Za večjo gotovost pa se priporoča 100 obratov v petih minutah.

1.6.2.3.2 Ločitev faz

Kadar je potrebno, se fazi ločita s centrifugiranjem. To se opravi z laboratorijsko centrifugo, v kateri se vzdržuje sobna temperatura, če pa se uporabi centrifuga brez termostata, se centrifugirke pustijo najmanj eno uro pred analizo pri temperaturi preskusa, da se vzpostavi ravnotežje.

▼B

1.6.2.4 *Analiza*

Za določitev porazdelitvenega koeficienta je treba določiti koncentracijo preskusne snovi v obeh fazah. To se lahko stori tako, da se vzame alikvot vsake izmed dveh faz iz vsake epruvete za vsak preskusni pogoj in se analizira po izbranem postopku. Izračunati je treba skupno količino snovi v obeh fazah in jo primerjati s prvotno vneseno količino snovi.

Vzorec vodne faze je treba odvzeti s postopkom, ki kar se da zmanjša tveganje, da bi se v njem pojavile sledi n-oktanola: v ta namen se lahko uporabi steklena brizga z zamenljivo iglo. Brizga se najprej delno napolni z zrakom. Ta zrak se počasi iztiska med potiskanjem igle skozi plast n-oktanola. V brizgo se vsrka primeren volumen vodne faze. Brizga se hitro potegne iz raztopine in igla se odstrani. Vsebina brizge se nato lahko uporabi kot vodni vzorec. Koncentracija v obeh ločenih fazah se po možnosti določi z metodo, ki je najbolj primerna za posamezno snov. Primeri morebitnih ustreznih analitskih metod so:

— fotometrične metode,

— plinska kromatografija,

— tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.

1.6.3 **HPLC metoda**

1.6.3.1 *Priprava*

Aparatura

Potrebujemo tekočinski kromatograf, opremljen s črpalko s stabilnim pretokom in ustreznim detektorjem. Priporoča se uporaba injektorja z injicirnimi zankami. Prisotnost polarnih skupin v stacionarni fazi lahko resno zmanjša učinkovitost kolone HPLC. Zato mora imeti stacionarne faze le minimalni odstotek polarnih skupin (11). Lahko se uporabijo na trgu dostopna polnila za mikro kolone z reverzno fazo ali že pripravljene kolone. Med injektorskim sistemom in analitsko kolono se lahko namesti predkolona.

Mobilna faza

Topilo za eluiranje se pripravi iz metanola za HPLC in vode za HPLC ter pred uporabo razplini. Izvesti je treba izokratsko izpiranje. Uporabiti je treba razmerja metanol/voda z deležem vode najmanj 25 %. Običajno je zmes metanol/voda v razmerju 3:1 (v/v) zadovoljiva za eluiranje snovi z log P 6 v eni uri pri pretoku 1 ml/min. Pri snoveh z večjo vrednostjo log P bo morda treba skrajšati elucijski čas (in elucijski čas referenčnih snovi) z zmanjšanjem polarnosti mobilne faze ali podaljšanjem kolone.

Snovi z zelo majhno topnostjo v n-oktanolu dajo pri metodi HPLC velikokrat nenormalno majhne vrednosti log P_{ow}; vrhove takih snovi včasih spremlja fronta topila. To se verjetno zgodi zato, ker je porazdelitveni proces prepočasen, da bi dosegla ravnotežje v času, ki je običajno potreben za ločitev s HPLC. V takem primeru je lahko učinkovit način za dosego zanesljive vrednosti zmanjšanje pretoka in/ali razmerja metanol/voda.

▼B

Preskusne in referenčne snovi morajo biti topne v mobilni fazi v zadostnih koncentracijah, da je omogočena njihova detekcija. Dodatki v zmesi metanol/voda se lahko uporabijo le izjemoma, saj spremenijo lastnosti kolone. Za kromatograme z dodatki je obvezna uporaba ločene kolone enake vrste. Če zmes metanol/voda ni primerna, se lahko uporabijo druge zmesi organsko topilo/voda, npr. etanol/voda ali acetonitril/voda.

Pri snoveh, ki disociirajo na ione, je pH eluenta zelo pomemben. Mora biti v delovnem območju pH kolone, ki je običajno med 2 in 8. Priporoča se dodajanje pufra. Preprečiti je treba obarjanje soli in razpadanje kolone, ki lahko nastaneta pri nekaterih zmeseh organske faze in pufra. Meritve HPLC s stacionarnimi fazami z osnovo iz silicijevega dioksida in pH nad 8 niso priporočljive, saj uporaba alkalne mobilne faze lahko povzroči hitro poslabšanje učinkovitosti kolone.

Topljenci

Referenčne snovi morajo biti čim bolj čiste. Snovi, ki se bodo uporabile za preskus ali umerjanje, se po možnosti raztopijo v mobilni fazi.

Preskusni pogoji

Med merjenjem se temperatura ne sme spreminjati za več kot ± 2 K.

1.6.3.2 **Merjenje**

Izračun mrtvega časa t_o

Mrtvi čas t_o se lahko določi z uporabo bodisi homolognih vrst (npr. n-alkilmetil-ketoni) bodisi z organskimi spojinami, ki se ne zadržijo v koloni (npr. tiosečnina ali formamid). Za izračun mrtvega časa t_o z uporabo homolognih vrst se injicira niz najmanj sedmih spojin homologne vrste in določijo njihovi retenzijski časi. Izriše se krivulja dobljenih retenzijskih časov $t_{r(nc + 1)}$ v odvisnosti od $t_{r(nc)}$ ter določita presek, a, in naklon, b, regresijske enačbe:

$$t_{r(nc+1)} = a + bt_{r(nc)}$$

(n_c = število ogljikovih atomov). Mrtvi čas t_o je določen z:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Umeritvena krivulja

Naslednji korak je izdelava krivulje vrednosti log k v odvisnosti od log P za ustrezne referenčne snovi. V praksi to pomeni, da se hkrati injicira 5 do 10 standardnih referenčnih snovi, katerih log P je blizu pričakovanega območja, in določijo retenzijski časi, po možnosti na integratorju zapisovalniku, povezanem z detektorjem. Izračunajo se ustrezni logaritmi faktorjev kapacitete, log k, in nariše se krivulja log k v odvisnosti od log P, določenega z metodo stresanja bučke. Umerjanje se izvaja redno, najmanj enkrat dnevno, tako da se lahko upoštevajo morebitne spremembe v delovanju kolone.

Določanje faktorja kapacitete preskusne snovi

Preskusna snov se injicira v najmanjšo možno količino mobilne faze. Določi se retenzijski čas (z dvema vzporednima meritvama), ki omogoča izračun faktorja kapacitete k. Iz korelacijske krivulje za referenčne snovi se lahko interpolira porazdelitveni koeficient preskusne snovi. Pri zelo majhnih in zelo velikih porazdelitvenih koeficientih je potrebna ekstrapolacija. V takih primerih je treba še posebej upoštevati meje zaupanja regresijske premice.

2. **PODATKI**

Metoda stresanja bučke

Zanesljivost določenih vrednosti P je mogoče preskusiti s primerjanjem srednjih vrednosti vzporednih določitev s skupno srednjo vrednostjo.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— kadar metode niso uporabne (npr. pri površinsko aktivnih snoveh), je treba navesti izračunano vrednost ali oceno na podlagi topnosti v n-oktanolu in topnosti v vodi,

— vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot in agregatnega stanja snovi.

Za metodo stresanja bučke:

— rezultat predhodne ocene, če je bila opravljena,

— temperatura določanja,

— podatki o uporabljenih analitskih postopkih za določanje koncentracij,

— čas in hitrost centrifugiranja, če je bilo uporabljeno,

▼B

— izmerjene koncentracije v obeh fazah za vsako določitev (to pomeni, da bo v poročilu skupaj 12 koncentracij),

— masa preskusne snovi, volumen vsake faze, uporabljene v vsaki posodi, in izračunana skupna količina preskusne snovi v vsaki fazi po vzpostavitvi ravnotežja,

— izračunane vrednosti porazdelitvenega koeficienta (P) in njihova srednja vrednost za vsak sklop preskusnih pogojev ter srednja vrednost vseh določitev. Če kar koli kaže na odvisnost porazdelitvenega koeficienta od koncentracije, je to treba vključiti v poročilo,

— standardna deviacija posameznih vrednosti P od njihove srednje vrednosti,

— srednja vrednost P vseh določitev mora biti izražena tudi z logaritmom (osnova 10),

— izračunana teoretična vrednost P_{ow}, če je bila določena, ali če je izmerjena vrednost > 10^4,

— pH uporabljene vode in vodne faze med preskusom,

— če se uporabijo pufri, utemeljitev uporabe pufrov namesto vode, sestavo, koncentracijo in pH pufrov ter pH vodne faze pred in po preskusu.

Za metodo HPLC:

— rezultat predhodne ocene, če je bila opravljena,

— preskusna in referenčne snovi ter njihova čistost,

— temperaturno območje določitev,

— pH, pri katerem so bile opravljene določitve,

— podatki o analitski koloni in predkoloni, mobilni fazi ter načinu detekcije,

— podatki o retenziji in vrednosti log P iz literature za referenčne snovi, uporabljene za umerjanje,

— podatki o prilagojeni regresijski premici (log k v odvisnosti od log P),

— podatki o povprečni retenziji in interpolirana vrednost log P za preskusno snov,

— opis opreme in delovnih pogojev,

— elucijski diagrami,

— količine preskusne in referenčnih snovi, vnesene v kolono,

— mrtvi čas in kako je bil izmerjen.

▼B

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) –Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers *et al.*, J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base 1, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Dodatek 1

Računske/ocenjevalne metode

UVOD

Splošni uvod v računske metode, podatki in primeri so na voljo v Priročniku metod za ocenjevanje kemijskih lastnosti (a).

Izračunane vrednosti P_{ow} se lahko uporabijo:

— za izbiro primerne preskusne metode (območje metode stresanja bučke: log P_{ow}: –2 do 4, območje HPLC: log P_{ow}: 0 do 6),

— za izbiro ustreznih pogojev preskusa (npr. referenčne snovi za postopke HPLC, volumsko razmerje n-oktanol/voda za metodo stresanja bučke),

— kot notranje laboratorijsko preverjanje za odkrivanje možnih napak preskusa,

— za določitev ocene vrednosti P_{ow}, kadar preskusnih metod ni mogoče uporabiti zaradi tehničnih razlogov.

OCENJEVALNA METODA

Predhodna ocena porazdelitvenega koeficienta

Vrednost porazdelitvenega koeficienta se lahko oceni na podlagi topnosti preskusne snovi v čistih topilih:Za to:

$$P_{ocena} = \frac{\text{nasičenje } c_{n-\text{oktanol}}}{\text{nasičenje } c_{voda}}$$

RAČUNSKE METODE

Princip računskih metod

Vse računske metode temeljijo na formalni fragmentaciji molekule na ustrezne podstrukture, za katere so znane zanesljive vrednosti povečanja log P_{ow}. Vrednost log P_{ow} cele molekule se nato izračuna kot vsota ustreznih vrednosti za njene fragmente, kateri se prišteje vsota členov korekcije za intramolekularne interakcije.

Na voljo so seznami konstant fragmentov in členov korekcije (b)(c)(d)(e). Nekateri se redno dopolnjujejo (b).

Merila kakovosti

Na splošno se zanesljivost računske metode manjša z večjo kompleksnostjo preučevane snovi. Pri enostavnih molekulah z majhno molsko maso in eno ali dvema funkcionalnima skupinama se lahko pričakuje odstopanje za 0,1 do 0,3 enote log P_{ow} med rezultati različnih metod fragmentacije in izmerjeno vrednostjo. Pri bolj kompleksnih molekulah je območje napake lahko večje. To je odvisno od zanesljivosti in razpoložljivosti konstant fragmentov ter od zmožnosti prepoznavanja intramolekularnih interakcij (npr. vodikove vezi) in pravilne uporabe členov korekcije (manj težavno z računalniško programsko opremo CLOGP-3) (b). Pri snoveh, ki se lahko ionizirajo, je pomembno, da se pravilno upošteva naboj ali stopnja ionizacije.

▼B

Računski postopki

Hanschova p-metoda

Izvirna konstanta hidrofobnih substituentov, π, ki jo je vpeljal Fujira *et al.* (f), je opredeljena z:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

pri čemer je P_{ow} (PhX) porazdelitveni koeficient aromatskega derivata in P_{ow} (PhH) porazdelitveni koeficient izhodne spojine

(npr. $\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ (C_6H_5Cl) - $\log P_{ow}$ (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71).

Glede na svojo opredelitev je π-metoda uporabna predvsem za aromatsko substitucijo. Pripravljene so bile tabele π-vrednosti za veliko število substituentov (b)(c)(d). Uporabljajo se za izračunavanje log P_{ow} za aromatske molekule ali podstrukture.

Rekkerjeva metoda

Po Rekkerju (g) se vrednost log P_{ow} izračuna na naslednji način:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{členi interakcije})$$

kjer f_i predstavlja konstante za različne fragmente molekule in a_i pogostnost njihovega pojavljanja v preiskovani molekuli. Členi korekcije se lahko izrazijo kot skupni zmnožek ene same konstante C_m (tako imenovane „magične konstante“). Konstante fragmentov f_i in C_m so bile določene na podlagi seznama 1 054 vrednosti P_{ow}, dobljenih s poskusi (825 spojin), z uporabo multiple regresijske analize (c)(h). Členi interakcije se določijo v skladu z določenimi pravili, opisanimi v literaturi (e)(h)(i).

Hansch-Leova metoda

Po Hanschu in Leu (c) se vrednost log P_{ow} izračuna po enačbi:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kjer f_i predstavlja konstante različnih fragmentov molekule, F_j člene korekcije ter a_i in b_j ustrezne pogostnosti pojavljanja. Z metodo poskusa in napake ter z izpeljavo iz vrednosti P_{ow}, dobljenih s poskusi, sta bila sestavljena seznam vrednosti za atome in skupine ter seznam členov korekcije F_j (tako imenovanih „faktorjev“). Členi korekcije so bili razvrščeni v več različnih razredov (a)(c). Upoštevanje vseh pravil in členov korekcije je sorazmerno zapleteno in dolgotrajno. Razviti so bili programski paketi (b).

Kombinirana metoda

Izračunavanje log P_{ow} kompleksnih molekul se lahko znatno izboljša, če se molekula razdeli na večje podstrukture, za katere so na voljo zanesljive vrednosti log P_{ow}, bodisi iz tabel (b)(c) bodisi iz lastnih meritev. Taki fragmenti (npr. heterocikli, antrakinon, azobenzen) se nato lahko kombinirajo s Hanschovimi p-vrednostmi ali Rekkerjevimi ali Leovimi konstantami fragmentov.

Opombe

(i) Računske metode se lahko za delno ali popolnoma ionizirane snovi uporabijo le, kadar je mogoče upoštevati potrebne korekcijske faktorje;

▼B

(ii) če se lahko predpostavlja, da so intramolekularne vodikove vezi, je treba prišteti ustrezne člene korekcije (pribl. +0,6 do +1,0 enot log P_{ow}) (a). Znaki prisotnosti takih vezi se lahko pridobijo iz stereo modelov ali spektroskopskih podatkov o molekuli;

(iii) če je možnih več tavtomernih oblik, mora izračun temeljiti na najbolj verjetni obliki;

(iv) pozorno je treba spremljati spremembe seznamov konstant fragmentov.

Poročilo

Kadar se uporabijo računske/ocenjevalne metode, se v poročilo o preskusu, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— opis snovi (zmes, nečistote itd.),

— znaki kakršne koli možne intramolekularne vodikove vezi, disociacije, naboja in vseh drugih neobičajnih učinkov (npr. tavtomerija),

— opis računske metode,

— identifikacija podatkovne baze ali vir,

— posebnosti izbire fragmentov,

— izčrpno dokumentacijo izračuna.

LITERATURA

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. – Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Dodatek 2

Priporočene referenčne snovi za metodo HPLC

Št.	Referenčna snov	log P_{ow}	PKa
1	2-Butanon	0,3	
2	4-Acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzilakohol	1,1	
6	p-Metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksiocetna kislina	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-Metílbenzil alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzojska kislina	1,8	pKa = 3,47
16	4-Kloroanilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzen	1,9	
18	Cimetov alkohol	1,9	
19	Benzojska kislina	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Cinamska kislina	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metilbenzoat	2,1	
24	Benzen	2,1	
25	3-Metílbenzojska kislina	2,4	pKa = 4,27
26	4-Klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloroetilen	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etillbenzoat	2,6	
30	2,6-Diklorobenzonitril	2,6	
31	3-Klombenzojska kislina	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1 -Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dichloroaniline	2,8	
35	Chlorobenzene	2,8	
36	Allyl-phenylether	2,9	
37	Bromobenzen	3,0	

▼B

Št.	Referenčna snov	log P_{ow}	PKa
38	Etílbenzen	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diklorobenzen	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalen	3,6	
45	Fenilbenzoat	3,6	
46	Izopropilbenzen	3,7	
47	2,4.6-Triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzilbenzoat	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-.sek-butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triklorobenzen	4,2	
52	Dodekanojska kislina	4,2	
53	Difenileter	4,2	
54	n-Butylbenzene	4,5	
55	Fenantren	4,5	
56	Fluoroanten	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpiridin	4,9	
59	Trifenilamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Druge referenčne snoví za majhne vrednosti log P_{ow}		
1	Nikotinska kislina	- 0,07	

▼B

A.9 PLAMENIŠČE

1. METODA

1.1 UVOD

Pred izvajanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o vnetljivosti snovi. Preskusni postopek se lahko uporablja za tekoče snovi, katerih hlape je mogoče prižgati z viri vžiga. Preskusne metode, naštete v tem besedilu, so zanesljive samo za območja plamenišča, navedena pri posameznih metodah.

Pri izbiri metode je treba upoštevati možnost kemičnih reakcij med snovjo in posodo za vzorec.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Plamenišče je najnižja temperatura, popravljena glede na tlak 101,325 kPa, pri kateri tekočina razvije hlape, pri pogojih, opredeljenih v preskusni metodi, v takšni količini, da se v preskusni posodi tvori vnetljiva zmes hlapov in zraka.

Enote: ^{o}C

$t = T - 273{,}15$

(t v ^{o}C in T v K)

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP METODE

Snov se da v preskusno posodo in segreje ali ohladi do temperature preskusa v skladu s postopkom, opisanim v posamezni preskusni metodi. S poskušanjem vžiga se ugotavlja, ali vzorec vzplamti pri temperaturi preskusa ali ne.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

1.5.1 **Ponovljivost**

Ponovljivost se spreminja glede na območje plamenišča in uporabljeno preskusno metodo; največ 2 ^{o}C.

1.5.2 **Občutljivost**

Občutljivost je odvisna od uporabljene preskusne metode.

1.5.3 **Specifičnost**

Specifičnost nekaterih preskusnih metod je omejena na določena območja plamenišča in odvisna od podatkov o snovi (npr. velika viskoznost).

▼B

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Priprave**

Vzorec preskusne snovi se vnese v preskusno aparaturo v skladu z 1.6.3.1 in/ali 1.6.3.2.

Zaradi varnosti se priporoča, da se pri energetsko bogatih ali strupenih snoveh uporabi metoda, pri kateri je vzorec majhen, pribl. 2 cm^3.

1.6.2 **Preskusni pogoji**

Aparaturo je treba postaviti na mesto, kjer ni prepiha, če je to v skladu z varnostjo.

1.6.3 **Izvedba preskusa**

1.6.3.1 *Ravnotežna metoda*

Glej ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Neravnotežna metoda*

Aparatura Abel:

Glej BS 2000 del 170, NF M07-011, NF T66-009.

Aparatura Abel-Pensky:

Glej EN 57, DIN 51755 del 1 (za temperature od 5 do 65 °C), DIN 51755 del 2 (za temperature pod 5 °C), NF M07-036.

Aparatura Tag:

Glej ASTM D 56.

Aparatura Pensky-Martens:

Glej ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Opombe:

Kadar je plamenišče, določeno z neravnotežno metodo iz 1.6.3.2, enako 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ali 55 ± 2 °C, je treba to vrednost potrditi z ravnotežno metodo z uporabo iste aparature.

Za prijavo se lahko uporabijo le metode, s katerimi je mogoče določiti plamenišče.

Za določitev plamenišča viskoznih tekočin (barve, gume in podobno), ki vsebujejo topila, se lahko uporabijo samo aparature in preskusne metode, primerne za določanje plamenišča viskoznih tekočin.

Glej ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213, del 1.

▼B

2. **PODATKI**

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— navesti je treba uporabljeno metodo in kakršna koli možna odstopanja,

— rezultati in vse dodatne opombe, ki so pomembne za razlago rezultatov.

4. **VIRI**

Jih ni.

▼B

A.10 **VNETLJIVOST (TRDNE SNOVI)**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Pred izvajanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o morebitnih eksplozivnih lastnostih snovi.

Ta preskus je treba uporabljati samo za prašnate, granularne ali pastozne snovi.

Šteje se, da so lahko vnetljive samo snovi, katerih hitrost gorenja presega neko mejno vrednost, zato da ne bi bile mednje vključene vse snovi, ki jih je mogoče prižgati, ampak le tiste, ki gorijo hitro, ali tiste, katerih način gorenja je kakor koli posebej nevaren.

Posebej je nevarno, če se žarenje širi preko kovinskega prahu, zaradi težav pri gašenju. Kovinski prah se šteje za lahko vnetljivega, če omogoča razširjenje žarenja po celi masi v določenem času.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Čas gorenja izražen v sekundah.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.4 PRINCIP METODE

Snov se oblikuje v neprekinjen trak ali pas prahu, dolg približno 250 mm, in opravi se predhodni presejalni preskus, da se ugotovi, ali se ob vžigu s plinskim plamenom gorenje širi s plamenom ali tlenjem. Če se v določenem času gorenje razširi čez 200 mm pasu, se opravi popoln preskus za določanje hitrosti gorenja.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

▼B

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Predhodni presejalni preskus**

Snov se oblikuje v neprekinjen trak ali pas prahu, približno 250 mm dolg, 20 mm širok in 10 mm visok, na negorljivi, neporozni in toplotno slabo prevodni osnovni plošči. K enemu koncu pasu prahu se približa vroč plamen plinskega gorilnika (premer najmanj 5 mm), dokler se prah ne vname ali za najmanj 2 minuti (5 minut pri prahu iz kovin ali kovinskih zlitin). Zapiše se, ali se gorenje razširi vzdolž 200 mm pasu v 4 minutah preskusa (ali 40 minutah pri kovinskem prahu). Če se snov ne vname in se gorenje v 4 minutah (ali 40 minutah) trajanja preskusa ne razširi ne s plamenom ne s tlenjem vzdolž 200 mm pasu prahu, se šteje, da snov ni lahko vnetljiva, in nadaljnje preskušanje ni potrebno. Če se gorenje razširi po snovi do 200 mm dolžine pasu prahu v manj kot 4 minutah, ali manj kot 40 minutah pri kovinskem prahu, je treba izvesti spodaj opisani postopek (točka 1.6.2 in naslednje).

1.6.2 **Preskus hitrosti gorenja**

1.6.2.1 *Priprava*

Prašnate ali granularne snovi se narahlo natresejo v kalup, dolg 250 mm, s trikotnim prečnim prerezom z notranjo višino 10 mm in širino 20 mm. Na obe vzdolžni stranici kalupa je pritrjena kovinska plošča, kot stranska pregrada, ki sega 2 mm nad gornji rob trikotnega prečnega prereza (slika). Nato se kalup trikrat spusti z višine 2 cm na trdo podlago. Če je potrebno, se kalup dopolni. Nato se stranski pregradi odstranita in presežek snovi postrga stran. Na vrh kalupa se položi plošča iz negorljivega, neporoznega in toplotno slabo prevodnega materiala, nato se cela priprava obrne za 180^{o} in kalup odstrani.

Pastozne snovi se nanesejo na negorljivo, neporozno in toplotno slabo prevodno osnovno ploščo v obliki 250 mm dolgega valja s prečnim prerezom približno 1 cm^2.

1.6.2.2 *Preskusni pogoji*

V primeru snovi, občutljivih na vlago, je treba preskus opraviti čim prej po odstranitvi snovi iz vsebnika.

1.6.2.3 *Izvedba preskusa*

Kupček se namesti v digestorij, prečno na tok zraka.

Hitrost zraka mora biti zadostna, da dim ne uhaja v laboratorij, in se med preskusom ne sme spreminjati. Okrog aparature je treba namestiti zaslon, za zaščito pred prepihom.

Z vročim plamenom plinskega gorilnika (s premerom najmanj 5 mm) se prižge en konec kupčka. Ko kupček zgori do dolžine 80 mm, se izmeri hitrost gorenja naslednjih 100 mm.

▼B

Preskus se izvede šestkrat, vsakokrat s čisto, hladno ploščo, razen če se že prej dobi pozitiven rezultat.

2. **PODATKI**

Za vrednotenje sta pomembna čas gorenja iz predhodnega presejalnega preskusa (1.6.1) in najmanjši čas gorenja v do šestih preskusih (1.6.2.3).

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— opis preskusne snovi, njeno agregatno stanje vključno z vsebnostjo vlage,

— rezultati predhodnega presejalnega preskusa in preskusa hitrosti gorenja, če je bil opravljen,

— vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

3.2 RAZLAGA REZULTATA

Prašnate, granularne ali pastozne snovi se štejejo za lahko vnetljive, če je čas gorenja v katerem koli od preskusov, opravljenih v skladu s preskusnim postopkom, opisanim v 1.6.2, manj kot 45 sekund. Prah kovin ali kovinskih zlitin se šteje za lahko vnetljivega, če ga je mogoče prižgati in se plamen ali območje reakcije razširi po celotnem vzorcu v 10 minutah ali manj.

4. **VIRI**

NF T 20-042 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

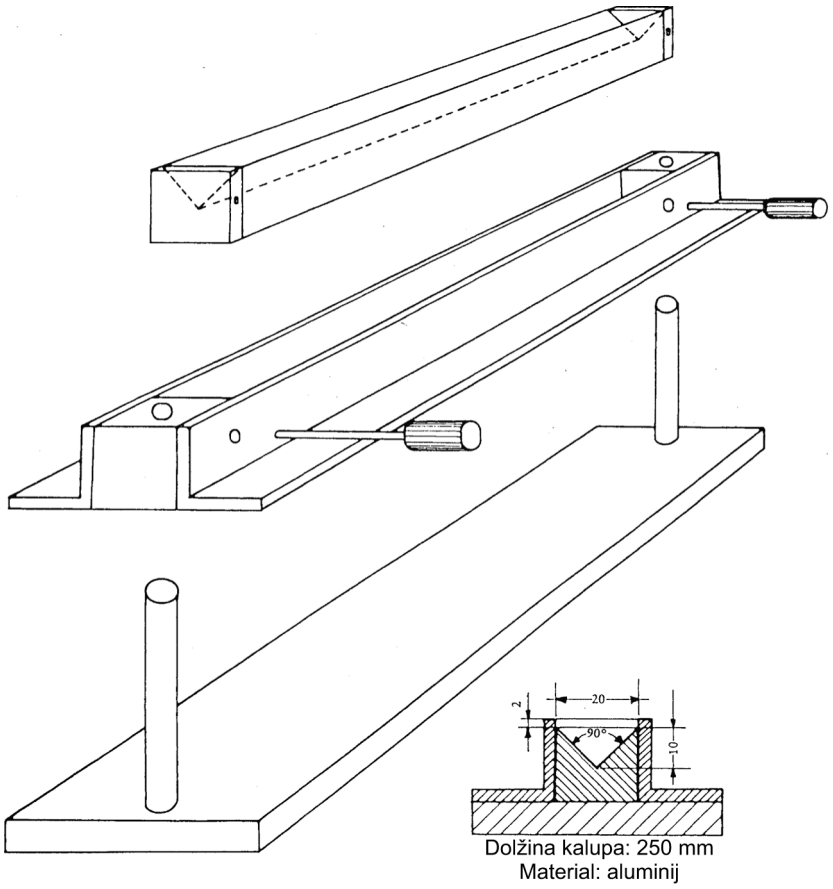
▼B

Dodatek

Slika

Kalup in pripomočki za pripravo kupčka

(Vse dimenzije so v milimetrih}



▼B

A.11 VNETLJIVOST (PLINI)

1. METODA

1.1 UVOD

Ta metoda omogoča ugotavljanje, ali so plini, zmešani z zrakom, pri sobni temperaturi (ca. 20 °C) in atmosferskem tlaku vnetljivi, in če so, v katerem območju koncentracij. Zmesi preskušanega plina z zrakom naraščajočih koncentracij se izpostavijo električni iskri, nato se opazuje, ali pride do vžiga.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Območje vnetljivosti je območje koncentracije med spodnjo in zgornjo mejo eksplozivnosti. Zgornja in spodnja meja eksplozivnosti sta tisti meji koncentracije vnetljivega plina v zmesi z zrakom, pri katerih se plamen ne širi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.4 PRINCIP METODE

Koncentracija plina v zraku se postopoma zvišuje in zmes se vsakokrat izpostavi električni iskri.

1.5. MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Aparatura**

Preskusna posoda je pokončni stekleni valj z notranjim premerom najmanj 50 mm in višino najmanj 300 mm. Vžigalni elektrodi sta med seboj oddaljeni 3 do 5 mm in nameščeni 60 mm nad dnom valja. Valj je opremljen z odprtino za razbremenitev tlaka. Aparaturo je treba zaščiti z zaslonom, da se omeji morebitna škoda zaradi eksplozije.

Kot vir vžiga se uporabi indukcijska iskra, ki traja 0,5 s in jo proizvede visoko napetostni transformator z izhodno napetostjo od 10 do 15 kV (največja vhodna moč 300 W). Primer primerne aparature je opisan v viru (2).

1.6.2 **Preskusni pogoji**

Preskus je treba izvajati pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

▼B

1.6.3 **Izvedba preskusa**

Z uporabo dozirne črpalke se v stekleni valj potisne znana koncentracija plina v zraku. Skozi zmes se pošlje iskra, nato se opazuje, ali se plamen loči od vira vžiga in neodvisno širi ali ne. Postopoma se povečuje koncentracija plina, vsakokrat za 1 volumski %, do pojava vžiga, kakor je opisan zgoraj.

Če kemijska struktura plina kaže, da bi bil lahko nevnetljiv, in se lahko izračuna sestava stehiometrične zmesi z zrakom, je treba preskusiti le zmesi v območju od 10 % pod do 10 % nad stehiometrično sestavo, v intervalih po 1 %.

2. **PODATKI**

Pojav širjenja plamena je edini relevantni podatek za določitev te lastnosti.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— opis uporabljene aparature skupaj z dimenzijami,

— temperatura, pri kateri je bil opravljen preskus,

— preskušene koncentracije in dobljeni rezultati,

— rezultat preskusa: nevnetljiv plin ali lahko vnetljiv plin,

— če se ugotovi, da je plin nevnetljiv, je treba navesti območje koncentracij, v katerem je bil preskušen v intervalih po 1 %,

— vse informacije in opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. **VIRI**

(1) NF T 20-041 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse – einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126–127. Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. 'Entwicklung

▼B

A.12 VNETLJIVOST (STIK Z VODO)

1. METODA

1.1 UVOD

Ta preskusna metoda se lahko uporablja za ugotavljanje, ali se zaradi reakcije snovi ob stiku z vodo ali vlažnim zrakom razvije nevarna količina plina ali plinov, ki so morda lahko vnetljivi.

Preskusna metoda se lahko uporablja za trdne in tekoče snovi. Ta metoda ni primerna za snovi, ki se v stiku z zrakom spontano vnamejo.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Lahko vnetljivo: snovi, ki v stiku z vodo ali vlažnim zrakom razvijejo nevarne količine lahko vnetljivih plinov s hitrostjo najmanj 1 liter/kg na uro.

1.3 PRINCIP METODE

Snov se preskusi v skladu s spodaj opisanim zaporedjem faz; če pri kateri koli fazi pride do vžiga, nadaljnje preskušanje ni potrebno. Če je znano, da snov z vodo ne reagira burno, se preskušanje začne s fazo 4 (1.3.4).

1.3.1 **Faza 1**

Preskusna snov se da v kadičko z destilirano vodo pri 20 °C, nato se zapiše, ali se razviti plin vname ali ne.

1.3.2 **Faza 2**

Preskusna snov se da na filtrirni papir, ki plava na površini destilirane vode pri 20 °C v posodici, nato se zapiše, ali se razviti plin vname ali ne. Edini namen filtrirnega papirja je obdržati snov na enem mestu, da se poveča verjetnost vžiga.

1.3.3 **Faza 3**

Preskusna snov se oblikuje v približno 2 cm visok kupček s premerom približno 3 cm. Na kupček se kane nekaj kapljic vode, nato se zapiše, ali se razviti plin vname ali ne.

1.3.4 **Faza 4**

Preskusna snov se zmeša z destilirano vodo pri 20 °C, nato se sedem ur v enournih presledkih meri hitrost razvijanja plina. Če je hitrost razvijanja plina po sedmih urah neenakomerna ali naraščajoča, je treba čas merjenja podaljšati na največ pet dni. Preskus se lahko prekine, če hitrost ob katerem koli času preseže 1 liter/kg na uro.

▼B

1.4 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6 OPIS METOD

1.6.1 **Faza 1**

1.6.1.1 *Preskusni pogoji*

Preskus se izvaja pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.1.2 *Izvedba preskusa*

Majhna količina (približno 2 mm v premeru) preskusne snovi se da v kadičko z destilirano vodo. Zapisati je treba, (i) ali se razvije kakršen koli plin in (ii) ali se ta plin vname. Če se plin vname, nadaljnje preskušanje snovi ni več potrebno, saj se snov obravnava kot nevarna.

1.6.2 **Faza 2**

1.6.2.1 *Aparatura*

Filtrirni papir se plosko položi na površino destilirane vode v kakršni koli ustrezni posodi, npr. izparilnici s premerom 100 mm.

1.6.2.2 *Preskusni pogoji*

Preskus se izvaja pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.2.3 *Izvedba preskusa*

Majhna količina preskusne snovi (približno 2 mm v premeru) se da na sredino filtrirnega papirja. Zapisati je treba, (i) ali se razvije kakršen koli plin in (ii) ali se ta plin vname. Če se plin vname, nadaljnje preskušanje snovi ni več potrebno, saj se snov obravnava kot nevarna.

1.6.3 **Faza 3**

1.6.3.1 *Preskusni pogoji*

Preskus se izvaja pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

1.6.3.2 *Izvedba preskusa*

Preskusna snov se oblikuje v približno 2 cm visok in 3 cm širok kupček z jamico na vrhu. V jamico se kane nekaj kapljic vode in zapiše, (i) ali se razvije kakršen koli plin in (ii) ali se ta plin vname. Če se plin vname, nadaljnje preskušanje snovi ni več potrebno, saj se snov obravnava kot nevarna.

▼B

1.6.4 **Faza 4**

1.6.4.1 *Aparatura*

Aparatura se sestavi, kakor je prikazano na sliki.

1.6.4.2 *Preskusni pogoji*

Preveri se ali posoda s preskusno snovjo vsebuje prah < 500 μm (velikost delcev). Če prah predstavlja več kot 1 % m/m celotne količine ali če je vzorec drobljiv, je treba celotno snov pred preskušanjem zmleti v prah, da se upošteva manjšanje velikosti delcev med shranjevanjem in uporabo; sicer se snov preskuša takšna, kakršna je bila prejeta. Preskus je treba izvajati pri sobni temperaturi (pribl. 20 °C) in atmosferskem tlaku.

1.6.4.3 *Izvedba preskusa*

V lij kapalnik aparature se da 10 do 20 ml vode in v erlenmajerico 10 g snovi. Volumen razvitega plina se lahko izmeri s kakršnimi koli primernimi pripomočki. Odpre se pipica lija, da voda steče v erlenmajerico, in sproži štoparica. V obdobju sedmih ur se vsako uro se izmeri razvijanje plina. Če je v tem obdobju razvijanje plina neenakomerno ali če ob koncu tega obdobja hitrost razvijanja plina narašča, se merjenje nadaljuje do največ petih dni. Če hitrost razvijanja plina kadar koli med merjenjem preseže 1 liter/kg na uro, se preskus lahko prekine. Ta preskus je treba izvesti trikrat.

Če kemijska identiteta plina ni znana, je treba plin analizirati. Če plin vsebuje lahko vnetljive sestavine in ni znano, ali je celotna zmes lahko vnetljiva, je treba pripraviti zmes z enako sestavo in jo preskusiti po metodi A.11.

2. **PODATKI**

Snov se šteje za nevarno, če:

— v kateri koli fazi preskusnega postopka pride do spontanega vžiga,

ali

— se razvija vnetljiv plin s hitrostjo več kot 1 liter/kg snovi na uro.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— podrobnosti o kakršni koli predpripravi preskusne snovi,

▼B

— rezultati preskusov (faze 1, 2, 3 in 4),

— kemijska identiteta razvitega plina,

— hitrost razvijanja plina, če se izvede faza 4 (1.6.4),

— kakršne koli dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. **VIRI**

(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

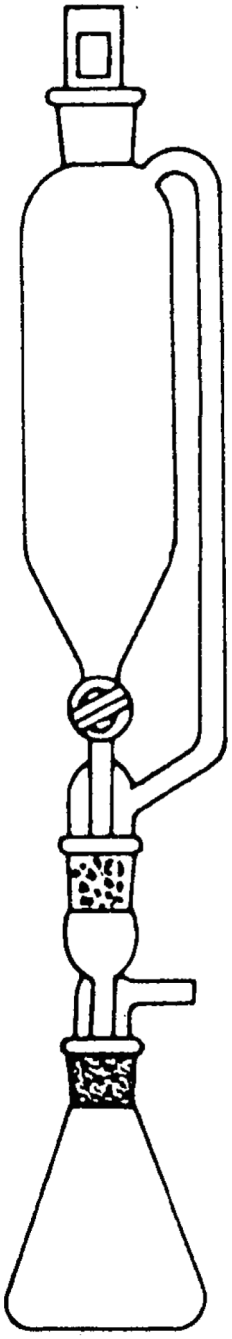
(2) NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Dodatek

Slika

Aparatura



▼B

A.13 **PIROFORNE LASTNOSTI TRDNIH SNOVI IN TEKOČIN**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Preskusni postopek se uporablja za trdne ali tekoče snovi, ki se že v majhnih količinah spontano vnamejo kmalu zatem, ko pridejo v stik z zrakom pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

V to metodo niso vključene snovi, ki morajo biti izpostavljene zraku več ur ali dni pri sobni temperaturi ali pri zvišani temperaturi, preden se vnamejo.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Šteje se, da so snovi piroforne, če se vnamejo ali povzročijo zoglenelost pri pogojih, opisanih v 1.6.

Morda bo treba preskusiti tudi samovnetljivost tekočin po metodi A.15 Temperatura samovžiga (tekočine in plini).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Niso določene.

1.4 PRINCIP METODE

Snov, naj bo trdna ali tekoča, se da v inertno posodo in za pet minut izpostavi zraku pri sobni temperaturi. Če se tekoča snov ne vname, jo absorbiramo na filtrirni papir in za pet minut izpostavimo zraku pri sobni temperaturi (pribl. 20 °C). Če se trdna snov ali tekočina vname ali če tekočina vžge ali poogleni filtrirni papir, se šteje, da je snov piroforna.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Ponovljivost: zaradi varnosti zadostuje en sam pozitiven rezultat, da se snov šteje za piroforno.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Aparatura**

V porcelanski lonček s premerom približno 10 cm se natrese približno 5 mm visok kupček diatomejske zemlje pri sobni temperaturi (ca. 20 °C).

Opomba:

Diatomejska zemlja ali katera koli druga primerljiva splošno dostopna inertna snov se šteje za reprezentativno prst, na katero bi se lahko v primeru nesreče razlila preskusna snov.

Za preskušanje tekočin, ki se ne vnamejo ob stiku z zrakom, če so v stiku z inertnim nosilcem, potrebujemo suh filtrirni papir.

▼B

1.6.2 **Izvedba preskusa**

(a) *Prašnate trdne snovi*

Z višine približno 1 m se na negorljivo površino strese 1 do 2 cm^3 prašnate preskusne snovi in opazuje, ali se snov vname med padanjem ali v petih minutah posedanja.

Preskus se izvede šestkrat, razen če že prej pride do vžiga.

(b) *Tekočine*

Približno 5 cm^3 preskusne tekočine se vlije v pripravljen porcelanski lonček in opazuje, ali se tekočina vname v petih minutah.

Če v šestih preskusih ne pride do vžiga, se opravijo naslednji preskusi:

Iz brizge se na prepognjen filtrirni papir nanese 0,5 ml preskusne snovi in opazuje, ali se filtrirni papir v petih minutah od nanosa tekočine vname ali zogleni. Preskus se izvede trikrat, razen če že prej pride do vžiga.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Preskus se lahko prekine, takoj ko se v katerem koli od preskusov dobi pozitiven rezultat.

2.2 VREDNOTENJE

Če se snov vname v petih minutah po dodatku v inertno posodo in izpostavitvi zraku ali če tekoča snov povzroči pooglenitev ali vžig filtrirnega papirja v petih minutah po dodatku in izpostavitvi zraku, se šteje, da je piroforna.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— rezultati preskusov,

— kakršne koli dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. **VIRI**

(1) NF T 20-039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14 EKSPLOZIVNE LASTNOSTI

1. METODA

1.1 UVOD

Metoda predstavlja preskusno shemo za ugotavljanje, ali trdna ali pastozna snov predstavlja nevarnost eksplozije, ko se izpostavi plamenu (toplotna občutljivost) ali udarcu ali trenju (občutljivost za mehanske dražljaje), in ali tekoča snov predstavlja nevarnost eksplozije, ko se izpostavi plamenu ali udarcu.

Metoda zajema tri dele:

(a) preskus toplotne občutljivosti (1);

(b) preskus mehanske občutljivosti za udarce (1);

(c) preskus mehanske občutljivosti za trenje (1).

Metoda daje podatke za oceno verjetnosti povzročitve eksplozije s pomočjo nekaterih običajnih dražljajev. Metoda ni namenjena ugotavljanju zmožnosti snovi, da eksplodira v kakršnih koli pogojih.

Metoda je primerna za ugotavljanje, ali bo snov predstavljala nevarnost eksplozije (toplotna in mehanska občutljivost), v pogojih, določenih v direktivi. Temelji na številnih vrstah aparatur, ki se splošno uporabljajo na mednarodni ravni (1) in običajno dajejo uporabne rezultate. Priznava se, da metoda ni dokončna. Lahko se uporabi aparatura, ki je drugačna od navedene, pod pogojem da je mednarodno priznana in se rezultati lahko zadovoljivo primerjajo z rezultati, dobljenimi z navedeno aparaturo.

Preskusov ni treba izvesti, kadar je iz razpoložljivih podatkov o termodinamiki (toplota proizvajanja, toplota razgrajevanja) in/ali odsotnosti nekaterih reaktivnih skupin (2) v strukturni formuli brez vsakršnega dvoma razvidno, da snov ni zmožna hitre razgradnje s proizvodnjo plinov ali sproščanjem toplote (tj. snov ne predstavlja nevarnosti eksplozije). Preskus mehanske občutljivosti za trenje pri tekočinah ni potreben.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Eksplozivno:

Snovi, ki lahko eksplodirajo ob izpostavitvi plamenu ali so občutljive za udarce ali trenje v posebni aparaturi (ali so bolj mehansko občutljive kakor 1,3-dinitrobenzen v nadomestni aparaturi).

1.3 REFERENČNE SNOVI

1,3-dinitrobenzen, tehnični, kristaliničen, presejan do velikosti delcev do 0,5 mm, za metode udarca in trenja.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, heksogen, ciklonit – CAS 121-82-4), rekristaliziran iz vodnega cikloheksanona, mokro presejan skozi sito z odprtinami 250 μm in zadržan na situ z odprtinami 150 μm ter posušen pri 103 ± 2 °C (4 ure) za drugi niz preskusov trenja in udarcev.

▼B

1.4 PRINCIP METODE

Za določitev varnih pogojev izvedbe treh preskusov občutljivosti so potrebni predhodni preskusi.

1.4.1 **Preskusi varnosti pri ravnanju s snovjo (3)**

Zaradi varnosti se pred izvedbo glavnih preskusov zelo majhni vzorci (ca. 10 mg) snovi segrevajo na odprtem s plamenom plinskega gorilnika ter izpostavijo udarcu v kakršni koli primerni aparaturi in trenju z uporabo kladiva in nakovala ali kakršne koli druge torne naprave. Namen preskusa je ugotoviti, ali je snov tako občutljiva in eksplozivna, da je treba predpisane preskuse občutljivosti, zlasti tiste za toplotno občutljivost, izvajati še posebej previdno, da se izvajalec preskusov ne poškoduje.

1.4.2 **Toplotna občutljivost**

Pri tej metodi se snov segreva v jekleni cevi, zaprti s šobnimi ploščami s spremenljivim premerom odprtine, da se določi, ali je verjetno, da bo snov eksplodirala pri intenzivni toploti in določeni zaprtosti.

1.4.3 **Mehanska občutljivost (udarec)**

Pri tej metodi se snov izpostavi udarcu določene mase, spuščene z določene višine.

1.4.4 **Mehanska občutljivost (trenje)**

Pri tej metodi se trdna ali pastozna snov izpostavi trenju med standardnimi površinami v določenih pogojih obremenitve in relativnega gibanja.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Niso navedena.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Toplotna občutljivost (učinek plamena)**

1.6.1.1 *Aparatura*

Aparaturo sestavlja jeklena cev za enkratno uporabo s pripravo za zapiranje za večkratno uporabo (slika 1), nameščena v grelno in zaščitno napravo. Vsaka cev je izdelana z globokim vlečenjem iz jeklene pločevine (glej dodatek), njen notranji premer je 24 mm, dolžina 75 mm in debelina stene 0,5 mm. Na odprtem koncu cevi je prirobnica, ki omogoča zapiranje cevi s šobnim sklopom. Ta sklop sestavlja proti tlaku odporna šobna plošča z odprtino na sredini, ki je trdno pritrjena na cev z dvodelno vijačno zvezo (matica in navojni obroč). Matica in navojni obroč sta izdelana iz krom-manganovega jekla (glej dodatek), ki ne proizvaja isker do 800 °C. Šobne plošče so debele 6 mm, izdelane iz jekla, obstojnega na vročino (glej dodatek), in so na voljo z različnimi premeri odprtin.

▼B

1.6.1.2 *Preskusni pogoji*

Običajno se snov preskuša takšna, kakršna je bila prejeta, čeprav je v nekaterih primerih, npr. pri stisnjenih, litih ali kako drugače kondenziranih, morda treba snov pred preskušanjem zdrobiti.

Pri trdnih snoveh se masa snovi, ki se bo uporabila v vsakem preskusu, določi z dvostopenjskim predhodnim preskusom. Stehtana cev se napolni z 9 cm^3 snovi, nato se snov potlači s pritiskom sile 80 N po celotnem prečnem prerezom cevi. Zaradi varnosti, ali kadar se stiskanjem lahko spremeni agregatno stanje snovi, se lahko uporabijo drugi postopki polnjenja; npr. če je snov zelo občutljiva za trenje, stiskanje ni primerno. Če je snov stisljiva, se dodajajo nove količine snovi z vsakokratnim stiskanjem, dokler ni cev napolnjena do višine 55 mm od roba. Določi se skupna masa, porabljena za napolnitev cevi do višine 55 mm od roba, nato se še dvakrat doda enaka količina snovi, ki se vsakokrat potlači s silo 80 N. Zatem se snov bodisi doda s stiskanjem bodisi odvzame, kar je potrebno, da se cev napolni do višine 15 mm od roba. Nato se izvede drugi predhodni preskus, ki se začne s stisnjeno količino, enako tretjini skupne mase, določene pri prvem predhodnem preskusu. Dodata se še dve taki količini in potlačita s silo 80 N, nato se z dodajanjem ali odvzemanjem snovi prilagodi njen nivo v cevi do višine 15 mm od roba. Pri vseh preskusih se uporabi količina trdne snovi, določena v drugem predhodnem preskusu; cev se polni v treh korakih, s tremi enako velikimi deli, pri čemer se vsak del s potrebno silo stisne do volumna 9 cm^3. (To se lahko olajša z uporabo distančnih obročev.)

Tekočine in geli se nalijejo v cev do višine 60 mm, pri čemer je treba pri gelih posebej paziti, da vmes ni praznih prostorov. Na cev se od spodaj natakne navojni obroč, vstavi se ustrezna šobna plošča, nato se nanese nekaj maziva na osnovi molibdenovega disulfida in privije matica. Nujno se je treba prepričati, da nič snovi ni ujete med prirobnico in ploščo ali v navoju.

Kot gorivo se uporabi propan iz industrijske jeklenke, opremljene z regulatorjem tlaka (60 do 70 mbar), ki se dovaja skozi merilnik in preko razdelilnika enakomerno porazdeli (kar se določi z opazovanjem plamenov gorilnikov) med štiri gorilnike. Gorilniki so po preskusni komori razporejeni, kakor prikazuje slika 1. Skupna poraba vseh štirih gorilnikov je 3,2 litra propana na minuto. Lahko se uporabijo tudi drugi plini in gorilniki, vendar mora biti hitrost segrevanja taka, kot je določena na sliki 3. Pri vseh aparaturah je treba periodično preverjati hitrost segrevanja z uporabo cevi, napolnjenih z dibutilftalatom, kakor je navedeno na sliki 3.

1.6.1.3 *Izvedba preskusov*

V vsakem preskusu se cev segreva, dokler je ne raznese vendar ne dalj kot 5 minut. Preskus, pri katerem cev razpade na tri ali več delov, ki so v nekaterih primerih lahko med seboj povezani s tankimi trakovi kovine, kakor je prikazano na sliki 2, se ovrednoti kot preskus, pri katerem je prišlo do eksplozije. Preskus, pri katerem cev razpade na manj delov ali sploh ne razpade, se šteje kot preskus, ki ne povzroči eksplozije.

▼B

Najprej se opravi niz treh preskusov z odprtino premera 6,0 mm na šobni plošči, in če pri nobenem ni eksplozije, se izvede drugi niz treh preskusov z odprtino premera 2,0 mm na šobni plošči. Če pri nobenem nizu preskusov ne nastane eksplozija, nadaljnje preskušanje ni potrebno.

1.6.1.4 *Vrednotenje*

Rezultat preskusa je pozitiven, če pri katerem koli od zgoraj navedenih nizov preskusov nastane eksplozija.

1.6.2 **Mehanska občutljivost (udarec)**

1.6.2.1 *Aparatura (slika 4)*

Bistveni deli značilne aparature z udarnim kladivom so blok iz jeklene litine z osnovno ploščo, nakovalo, stebriček, vodila, udarne uteži, sprožilna naprava in priprava za vzorec. Jekleno nakovalo, 100 mm (premer) × 70 mm (višina), je privito na zgornji del jeklenega bloka, 230 mm (dolžina) × 250 mm (širina) × 200 mm (višina), z ulito osnovno ploščo, 450 mm (dolžina) × 450 mm (širina) × 60 mm (višina). Stebriček iz brezšivne vlečene jeklene cevi je nameščen v držalu, privitem na zadnjo stran jeklenega bloka. Aparatura je s štirimi vijaki pritrjena na masiven cementni blok 60 × 60 × 60 cm, tako da sta vodilni tirnici točno navpični in udarna utež prosto pade. Na voljo za uporabo sta dve uteži, 5 in 10 kg, iz masivnega jekla. Udarna glava vsake uteži je iz utrjenega jekla, 60 do 63 HRC, in ima premer najmanj 25 mm.

Vzorec se zapre v udarno pripravo, ki jo sestavljata dva valja iz masivnega jekla s skupno osjo, postavljena eden nad drugim, v votlem jeklenem valju, ki predstavlja vodilni obroč. Premer masivnih jeklenih valjev mora biti 10 (–0,003, –0,005) mm in višina 10 mm, njuna površina mora biti zloščena, robovi zaobljeni (polmer krivulje 0,5 mm), njuna trdota pa znašati 58 do 65 HRC. Zunanji premer votlega valja mora biti 16 mm, zloščene izvrtine 10 (+0,005, +0,010) mm, višina pa 13 mm. Udarna priprava se sestavi na vmesnem nakovalu (premer 26 mm in višina 26 mm) iz jekla in centrira z obročem, ki ima odprtinice za odvajanje hlapov.

1.6.2.2 *Preskusni pogoji*

Volumen vzorca mora biti 40 mm^3 ali ustrezen za kakršno koli nadomestno aparaturo. Trdne snovi se preskušajo v suhem stanju in pripravljene na naslednji način:

(a) prašnate snovi se presejejo (sito z odprtinami 0,5 mm); v preskusu se uporabi vsa snov, ki se preseje skozi sito;

(b) stisnjene, ulite ali kako drugače kondenzirane snovi se razbijejo na manjše delce in presejejo; v preskusu se uporabi presejana frakcija s premerom 0,5 do 1 mm, ki mora biti reprezentativna za izvirno snov.

Snovi, ki se običajno dobavljajo v pastozni obliki, se, kadar je mogoče, preskušajo v suhem stanju, v vsakem primeru pa po odstranitvi čim večje količine redčila. Pri preskušanju tekočih snovi se med zgornjim in spodnjim jeklenim valjem pusti razmik 1 mm.

▼B

1.6.2.3 *Izvedba preskusov*

Izvede se niz šestih preskusov s spuščanjem mase 10 kg z višine 0,40 m (40 J). Če pri teh šestih preskusih pri 40 J nastane eksplozija, je treba izvesti dodaten niz šestih preskusov s spuščanjem mase 5 kg z višine 0,15 m (7,5 J). V drugih napravah se vzorec primerja z izbrano referenčno snovjo po uveljavljenem postopku (npr. s tehniko dviganja in spuščanja itd.).

1.6.2.4 *Vrednotenje*

Šteje se, da je rezultat pozitiven, če eksplozija (vzplamenitev in/ali pokanje sta enakovredna eksploziji) nastane najmanj enkrat med katerim koli od preskusov s predpisano udarno aparaturo ali če je vzorec bolj občutljiv kot 1,3-dinitrobenzen ali RDX pri drugačnem preskusu z udarcem.

1.6.3 **Mehanska občutljivost (trenje)**

1.6.3.1 *Aparatura (slika 5)*

Torna aparatura je sestavljena iz osnovne plošče iz jeklene litine, na katero je postavljena torna naprava. To sestavljata nepremični porcelanast valjček in premična porcelanasta ploščica. Porcelanasta ploščica je pritrjena na drsnik, ki se premika po dveh vodilih. Drsnik je povezan z elektromotorjem preko pomikalnika, ekscentra in ustreznega menjalnika, tako da se porcelanasta ploščica enkrat samkrat premakne naprej in nazaj pod porcelanastim valjčkom za 10 mm. Porcelanast valjček se lahko obremeni z npr. 120 ali 360 newtoni.

Porcelanaste ploščice so izdelane iz belega tehničnega porcelana (hrapavost 9 do 32 mm) in imajo dimenzije 25 mm (dolžina) × 25 mm (širina) × 5 mm (višina). Porcelanast valjček, je prav tako narejen iz belega tehničnega porcelana ter je dolg 15 mm, ima premer 10 mm in hrapava zaokrožena konca s polmerom zaokroženega dela 10 mm.

1.6.3.2 *Preskusni pogoji*

Volumen vzorca mora biti 10 mm^3 ali ustrezen za kakršno koli drugačno aparaturo.

Trdne snovi se preskušajo v suhem stanju in pripravljene na naslednji način:

(a) prašnate snovi se presejejo (sito z odprtinami 0,5 mm); v preskusu se uporabi vsa presejana snov;

(b) stisnjene, ulite ali kako drugače kondenzirane snovi se zdrobijo na manjše delce in presejejo; v preskusu se uporabi presejana frakcija s premerom < 0,5 mm.

Snovi, ki se običajno dobavljajo v pastozni obliki, se, kadar je mogoče, preskušajo v suhem stanju. Če se snovi ne da posušiti, se pasta (po odstranitvi največje možne količine redčila) preskusi kot 0,5 mm debel, 2 mm širok in 10 mm dolg film, pripravljen s šablono.

▼B

1.6.3.3 *Izvedba preskusov*

Porcelanast valjček se postavi na vzorec in obremeni. Med izvajanjem preskusa morajo zareze na porcelanasti ploščici ležati prečno na smer premikanja. Paziti je treba, da valjček stoji na vzorcu, da je pod valjčkom dovolj preskusne snovi in da se ploščica pravilno premika pod valjčkom. Pri pastoznih snoveh se za nanos snovi na ploščico uporabi 0,5 mm debela šablona z odprtino 2 × 10 mm. Porcelanasta ploščica se mora v 0,44 sekundah premakniti 10 mm naprej in nazaj pod porcelanastim valjčkom. Vsak del površine ploščice in valjčka se sme uporabiti le enkrat; oba konca vsakega valjčka se uporabita za dva preskusa in vsaka površina ploščice za tri preskuse.

Izvede se niz šestih preskusov z obremenitvijo 360 N. Če se v teh šestih preskusih dobi pozitiven rezultat, je treba izvesti dodaten niz šestih preskusov z obremenitvijo 120 N. V drugi aparaturi se vzorec primerja z izbrano referenčno snovjo po uveljavljenem postopku (npr. s tehniko dviganja in spuščanja itd.).

1.6.3.4 *Vrednotenje*

Šteje se, da je rezultat pozitiven, če eksplozija (prasketanje in/ali pokanje ali vzplamenitev so enakovredni eksploziji) nastane vsaj enkrat med katerim koli od preskusov s predpisano torno aparaturo ali če izpolnjuje enakovredna merila pri drugačnem tornem preskusu.

2. **PODATKI**

Načeloma se šteje, da snov predstavlja nevarnost eksplozije v smislu te direktive, če preskus toplotne, udarne ali torne občutljivosti da pozitiven rezultat.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— identiteta, sestava, čistost, vsebnost vlage itd., preskusne snovi,

— agregatno stanje vzorca in ali je bil zdrobljen, zdrobljen in/ali presejan,

— opažanja med preskusi toplotne občutljivosti (npr. masa vzorca, število delov itd.),

— opažanja med preskusi mehanske občutljivosti (npr. nastajanje velikih količin dima ali popoln razpad brez pokanja, plamena, isker, prasketanja itd.),

— rezultati vsake vrste preskusov,

— če je bila uporabljena drugačna aparatura, je treba navesti znanstveno utemeljitev ter dokaze o soodvisnosti med rezultati, pridobljenimi s predpisano aparaturo, in tistimi, pridobljenimi z enakovredno aparaturo,

▼B

— kakršne koli koristne opombe, na primer sklicevanja na preskuse s podobnimi proizvodi, ki so lahko pomembne za pravilno razlago rezultatov,

— vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

3.2 RAZLAGA IN VREDNOTENJE REZULTATOV

V poročilu o preskusu je treba navesti tudi kakršne koli rezultate, ki se štejejo za lažne, anomalne ali nereprezentativne. Če je treba katerega od rezultatov zavreči, je treba navesti obrazložitev in rezultate kakršnega koli nadomestnega ali dopolnilnega preskušanja. Če se anomalnega rezultata ne da obrazložiti, ga je treba sprejeti takšnega, kakršen je, in ga uporabiti za ustrezno razvrstitev snovi.

4. **VIRI**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30–42.

(4) NF T 20-038 (September 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

▼B

Dodatek

Primer specifikacije materiala za preskus toplotne občutljivosti (glej DIN 1623)

(1) Cev: Specifikacija materiala št. 1.0336.505 g

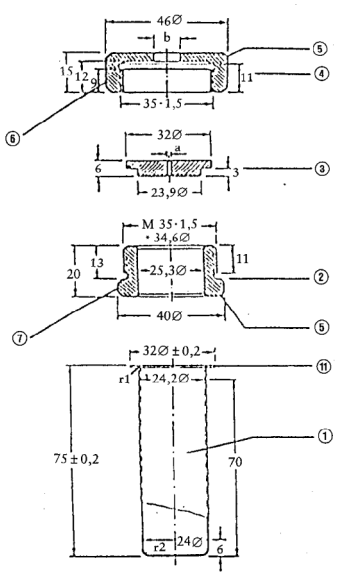
(2) Šobna plošča: Specifikacija materiala št. 1.4873

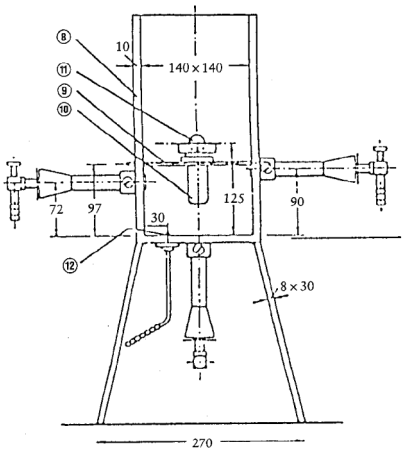
(3) Navojni obroč in matica: Specifikacija materiala št. 1.3817

Slika 1

Aparatura za toplotno občutljivost

(vse dimenzije so v milimetrih)





Sl. 1a Jeklena cev in dodatki

(1) cev
(1a) zunanja prirobnica
(2) navojni obroč; navoj z majhnim trenjem
(3) šobna plošča, a = 2,0 ali 6,0 mm
(4) matica, b = 10 mm
(5) prirobljena površina
(6) 2 površini za ključ št. 41

Sl. 1b Grelna in zaščitna naprava

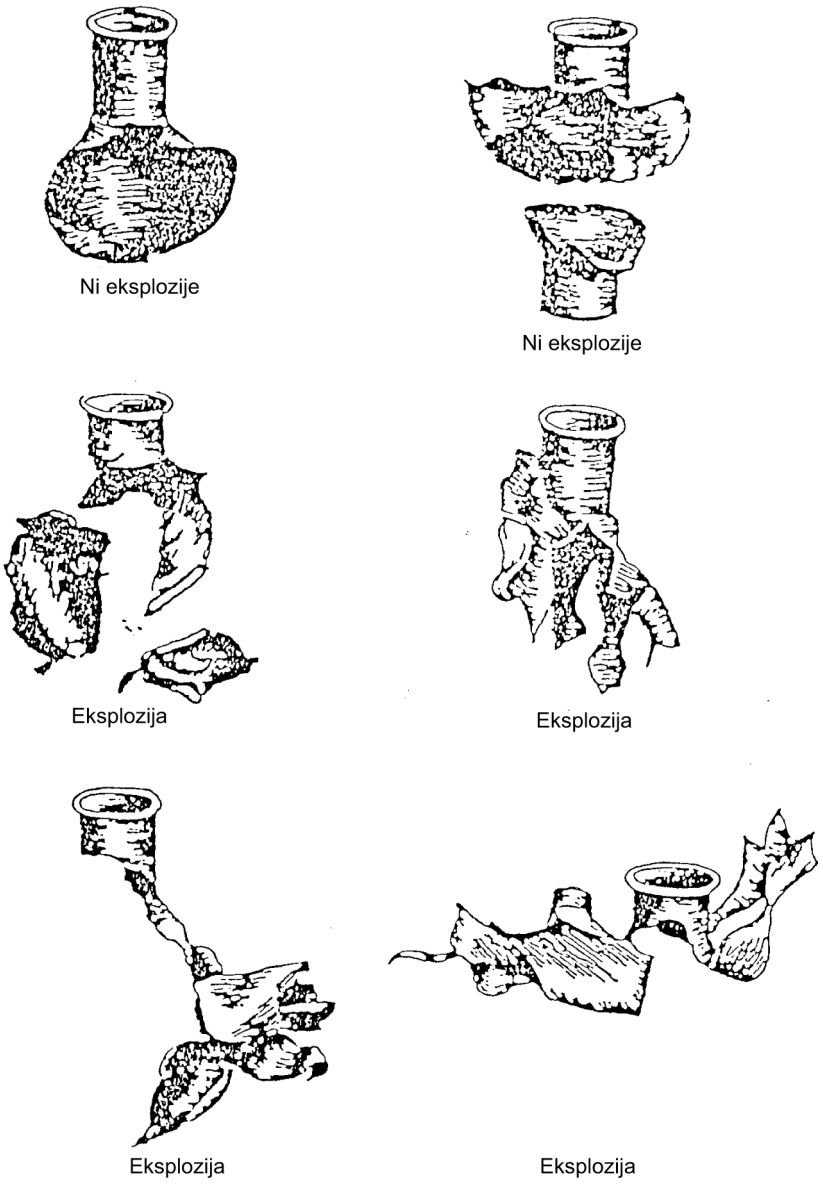
(7) 2 površini za ključ št. 36
(8) škatla, odporna proti drobcem
(9) 2 podporni palici za cev
(10) sestavljena cev
(11) položaj zadnjega gorilnika; drugi gorilniki so vidni
(12) šoba za vžigalni plamen

▼B

Slika 2

Preskus toplotne občutljivosti

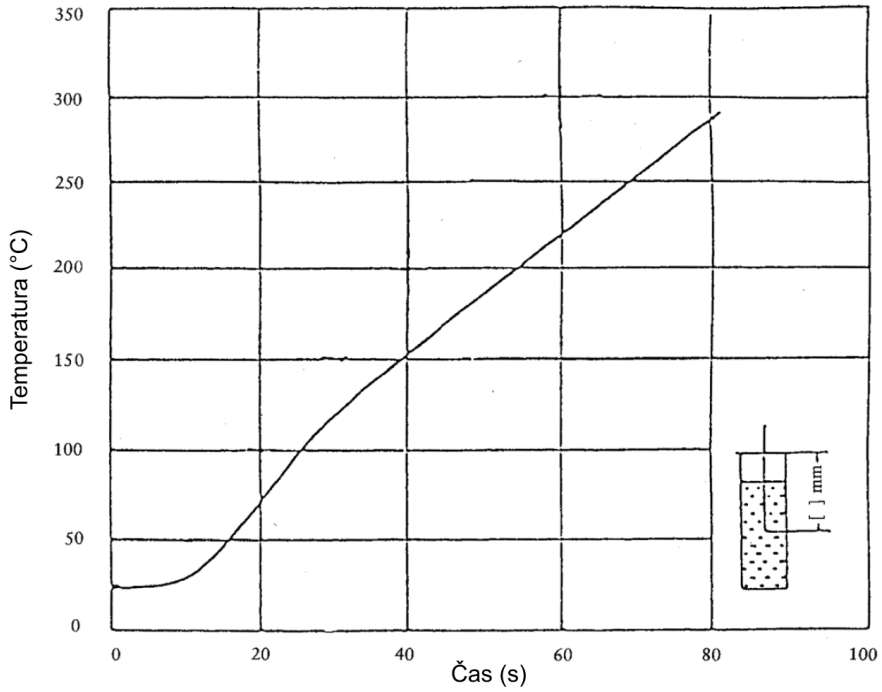
(primeri fragmentacije)



▼B

Slika 3

Umeritev hitrosti segrevanja pri preskusu toplotne občutljivosti



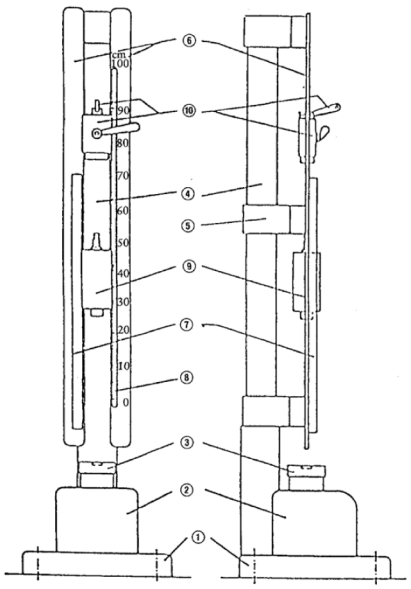
Krivulja temperatura/čas, dobljena s segrevanjem dibutilftalata (27 cm^5) v zaprti (šobna plošča 1,5 mm) cevi ob pretoku propana 3,2 litra/minuto. Temperatura se meri s termočlenom nikelj-krom s premerom 1 mm v ovoju iz nerjavečega jekla, nameščenim centralno, 43 mm pod robom cevi. V območju med 135 in 285 °C mora biti hitrost segrevanja med 185 in 215 K/minuto.

▼B

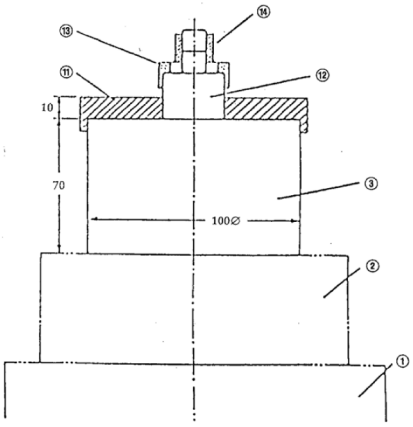
Slika 4

Aparatura za udarni preskus

(vse dimenzije so v milimetrih)



Sl. 4a Udarno kladivo, od spredaj in od strani, splošna skica



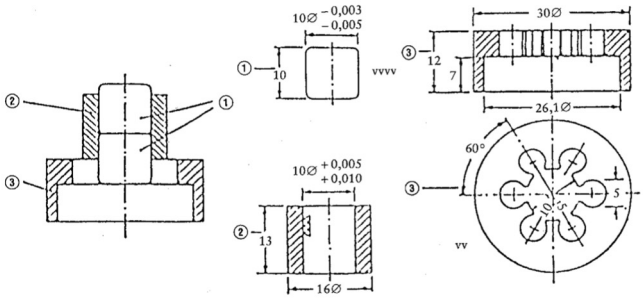
Sl. 4b Udarno kladivo, spodnji del

(1) osnovna plošča, 450 × 450 × 60
(2) jeklen blok, 230 × 250 × 200
(3) nakovalo, 100 (premer) × 70
(4) stebriček
(5) osrednji prečni nosilec
(6) 2 vodili
(7) nazobčana tračnica
(8) graduirana lestvica
(9) udarno kladivo (udarna utež)
(10) naprava za pritrjevanje in sproščanje
(11) centrirna plošča
(12) vmesno nakovalo (zamenljivo). 26 (premer) × 26
(13) centrirni obroč z odprtinicami
(14) udarna priprava

▼B

Slika 4

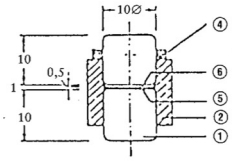
Nadaljevanje

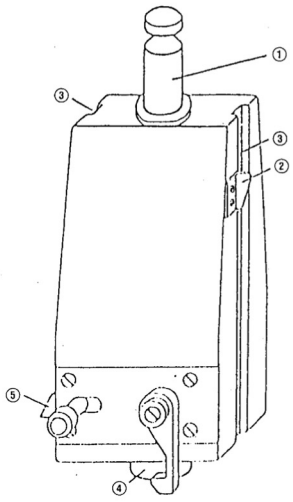


Sl. 4c Udarna priprava za prašnate in pastozne snovi

Sl. 4d Udarna priprava za tekoče snovi

(1) jeklena valja
(2) vodilni obroč za jeklena valja
(3) centrirni obroč z odprtinicami
  (a) vzdolžni prerez
  (b) prečni prerez
(4) gumijast obroč
(5) tekoča snov (40 mm^3)
(6) prostor brez tekočine





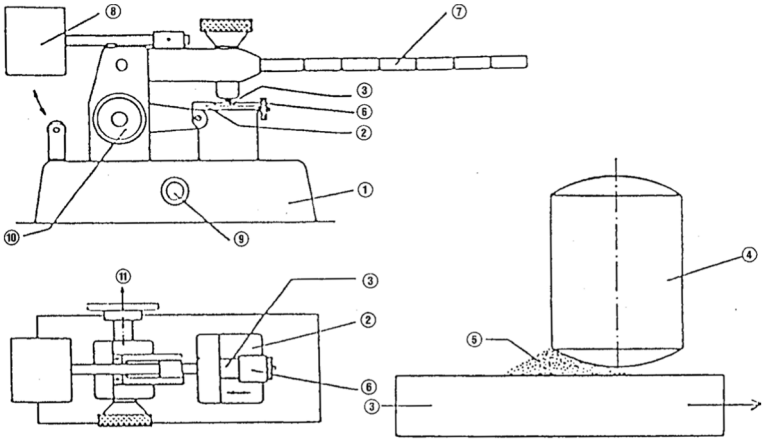
Sl. 4e Kladivo (udarna utež 5 kg)

(1) zatič za obešanje
(2) kazalec višine
(3) vodilni žleb
(4) valjasta udarna glava
(5) priprava za zaustavitev odboja

▼B

Slika 5

Aparatura za občutljivost za trenje



Sl. 5a Torna aparatura; naris in tloris

S1.5b Začetni položaj valjčka na vzorcu

(1) jeklena osnovna plošča
(2) premični drsnik
(3) porcelanasta ploščica 25 × 25 × 5 mm, pritrjena na drsnik
(4) nepremični porcelanast valjček, 10 (premer) × 15 mm
(5) vzorec, približno 10 mm^3
(6) držalo za valjček
(7) obremenitvena ročica
(8) protiutež
(9) stikalo
(10) kolesce za nastavitev drsnika na začetni položaj
(11) smer elektromotorja

▼B

A.15 TEMPERATURA SAMOVŽIGA (TEKOČINE IN PLINI)

1. METODA

1.1 UVOD

Eksplozivne snovi in snovi, ki se spontano vnamejo v stiku z zrakom pri sobni temperaturi, se ne smejo preskušati s tem preskusom. Preskusni postopek se uporablja za pline, tekočine in pare, ki se ob prisotnosti zraka lahko vnamejo na vroči površini.

Temperaturo samovžiga lahko znatno zniža prisotnost katalitskih nečistot, material površine ali večji volumen preskusne posode.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Stopnja samovnetljivosti se izraža s temperaturo samovžiga. Temperatura samovžiga je najnižja temperatura, pri kateri se preskusna snov vname, če se pomeša z zrakom v pogojih, opredeljenih v preskusni metodi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčne snovi so naštete v standardih (glej 1.6.3). Predvsem naj bi se uporabljale za občasno preverjanje učinkovitosti metode in za omogočanje primerjave z rezultati drugih metod.

1.4 PRINCIP METODE

S to metodo se določa najnižja temperatura notranje površine posode, pri kateri se plin, para ali tekočina, vbrizgana v posodo, vname.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Ponovljivost se spreminja v skladu z območjem temperatur samovžiga in uporabljeno preskusno metodo.

Občutljivost in specifičnost sta odvisni od uporabljene preskusne metode.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Aparatura**

Aparatura je opisana v metodi iz 1.6.3.

1.6.2 **Preskusni pogoji**

Preskus na vzorcu preskusne snovi se izvede v skladu z metodo iz 1.6.3.

1.6.3 **Izvedba preskusa**

Glej IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **PODATKI**

Zapišejo se temperatura preskusa, atmosferski tlak, uporabljena količina vzorca, čas, ki preteče do samovžiga.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— natančna specifikacija snovi (identiteta in nečistote),

— uporabljena količina vzorca, atmosferski tlak,

— uporabljena aparatura,

— rezultati meritev (temperature preskusa, rezultati v zvezi z vžigom, ustrezni časovni zamik),

— vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

4. **VIRI**

Jih ni.

▼B

A.16 **RELATIVNA TEMPERATURA SAMOVŽIGA ZA TRDNE SNOVI**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Eksplozivne snovi in snovi, ki se spontano vnamejo v stiku z zrakom pri sobni temperaturi, se ne smejo preskušati s tem preskusom.

Namen tega preskusa je zagotoviti predhodne podatke o samovnetljivosti trdnih snovi pri povišani temperaturi.

Če se vročina, ki se razvije ob reagiranju snovi s kisikom ali eksotermni razgradnji, ne porazgubi dovolj hitro po okolici, se bo snov samosegrevala in vnela. Samovžig se torej pojavi, kadar se toplota proizvaja hitreje, kot se izgublja.

Preskusni postopek je koristen kot predhodni presejalni preskus za trdne snovi. Zaradi zapletene narave vžiga in izgorevanja trdnih snovi je treba temperaturo samovžiga, določeno v skladu s to preskusno metodo, uporabljati le za primerjanje.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Temperatura samovžiga, dobljena s to metodo, je najnižja temperatura okolja, izražena v ^{o}C, pri kateri se določen volumen snovi v določenih pogojih vname.

1.3. REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4. PRINCIP METODE

Določen volumen preskusne snovi se da v peč pri sobni temperaturi; zapisuje se krivulja temperatura/čas, ki se nanaša na razmere v sredini vzorca, medtem ko se temperatura peči viša do 400 ^{o}C, ali do tališča, če je to nižje, s hitrostjo 0,5 ^{o}C/min. Pri tem preskusu se temperatura peči, pri kateri temperatura vzorca doseže 400 ^{o}C s samosegrevanjem, imenuje temperatura samovžiga.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Aparatura**

1.6.1.1 *Peč*

Laboratorijska peč s temperaturnim programom (volumen približno 2 litra), opremljena s sistemom za naravno kroženje zraka in protieksplozijsko zaščito. Da se prepreči nastanek morebitne eksplozije, je treba kakršnim koli razgradnim plinom preprečiti stik z električnimi grelnimi elementi.

▼B

1.6.1.2 *Kocka iz žičnate mreže*

Kos žičnate mreže iz nerjavnega jekla z odprtinami 0,045 mm se razreže v skladu z vzorcem na sliki 1. Mreža se pregane in poveže z žico v kocko brez zgornje ploskve.

1.6.1.3 *Termočlena*

Primerna termočlena.

1.6.1.4 *Zapisovalnik*

Kakršen koli dvokanalni zapisovalnik, umerjen na 0 do 600 °C ali ustrezno napetost.

1.6.2 **Preskusni pogoji**

Snovi se preskušajo takšne, kakršne so bile prejete.

1.6.3 **Izvedba preskusa**

Kocka se napolni s preskusno snovjo, nato se narahlo stresa in polni s snovjo, dokler ni povsem polna. Kocka se nato obesi na sredino peči pri sobni temperaturi. En termočlen se namesti v sredino kocke, drugi pa med kocko in steno peči, da se beleži temperatura peči.

Temperatura se viša do 400 °C ali do tališča, če je to nižje, s hitrostjo 0,5 °C/min in med tem se ves čas zapisujeta temperaturi peči in vzorca.

Ko se snov vname, termočlen v vzorcu pokaže izjemno skokovit porast temperature nad temperaturo peči.

2. **PODATKI**

Za vrednotenje je pomembna temperatura peči, pri kateri temperatura vzorca s samosegrevanjem doseže 400 °C (glej sliko 2).

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— opis preskusne snovi,

— rezultati merjenja, vključno s krivuljo temperatura/čas,

— vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov.

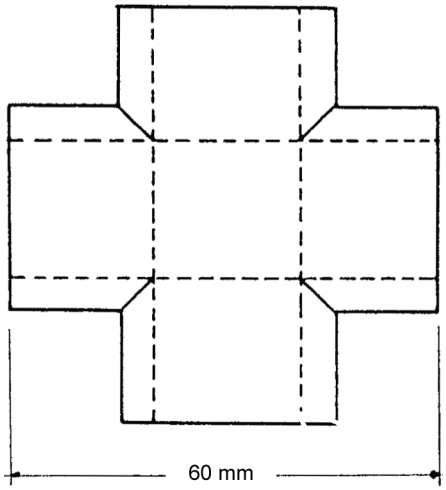
4. **VIRI**

NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

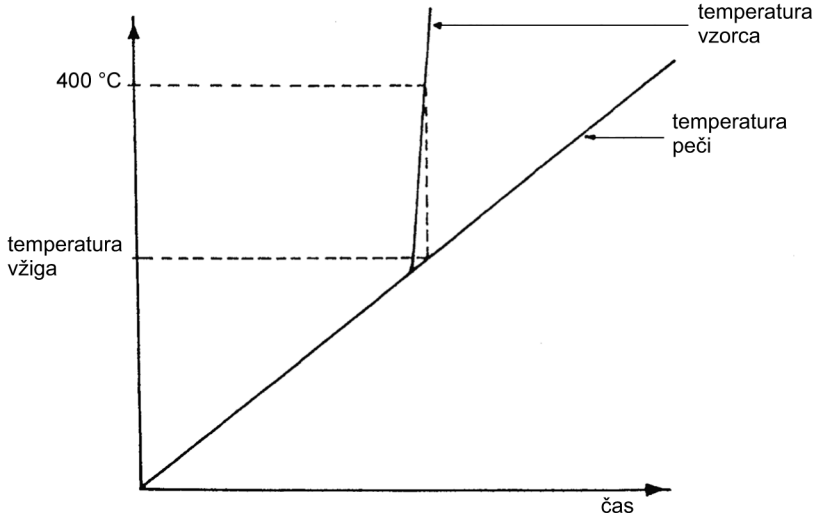
Slika 1

Vzorec za 20 mm-preskusno kocko



Slika 2

Značilna krivulja temperatura/čas



▼B

A.17 OKSIDACIJSKE LASTNOSTI (TRDNE SNOVI)

1. METODA

1.1 UVOD

Pred izvajanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o vseh morebitnih eksplozivnih lastnostih snovi.

Ta preskus ni uporaben za tekočine, pline, eksplozivne ali lahko vnetljive snovi ali organske perokside.

Preskusa ni treba izvesti, če se na podlagi preučitve strukturne formule brez vsakršnega dvoma ugotovi, da snov ni zmožna eksotermno reagirati z gorljivo snovjo.

Treba je izvesti predhodni preskus, da se ugotovi, ali so pri izvedbi preskusa potrebni posebni varnostni ukrepi.

1.2 OPREDELITEV IN ENOTE

Čas gorenja: reakcijski čas v sekundah, v katerem reakcijsko območje prepotuje določeno razdaljo vzdolž kupčka, v skladu s postopkom iz 1.6.

Hitrost gorenja: izražena v milimetrih na sekundo.

Največja hitrost gorenja: največja vrednost izmed hitrosti gorenja, dobljenih z zmesmi, ki vsebujejo od 10 do 90 utežnih % oksidanta.

1.3 REFERENČNA SNOV

Pri preskusu in predhodnem preskusu se kot referenčna snov uporablja barijev nitrat (analitska čistost).

Referenčna zmes je zmes barijevega nitrata in uprašene celuloze, pripravljena v skladu z 1.6, ki ima največjo hitrost gorenja (običajno zmes s 60 utežnimi % barijevega nitrata).

1.4 PRINCIP METODE

Zaradi varnosti se izvede predhodni preskus. Kadar predhodni preskus jasno pokaže, da ima preskusna snov oksidacijske lastnosti, nadaljnje preskušanje ni potrebno. V nasprotnem primeru je treba s snovjo izvesti popoln preskus.

V popolnem preskusu se pripravijo zmesi iz preskusne snovi in določene gorljive snovi v različnih razmerjih. Vsaka zmes se nato oblikuje kupček, ki se na enem koncu prižge. Največja določena hitrost gorenja se primerja z največjo hitrostjo gorenja referenčne zmesi.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Če je treba snov drobiti in mešati, se za to lahko uporabi katera koli metoda, pod pogojem da razlika v največji hitrosti gorenja v šestih ločenih preskusih ne odstopa od aritmetične sredine za več kakor 10 %.

▼B

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Priprava**

1.6.1.1 *Preskusna snov*

Velikost delcev v vzorcu se zmanjša do < 0,125 mm po naslednjem postopku: preskusna snov se preseje, preostala frakcija se zmelje in postopek se ponavlja, dokler skozi sito ni presejana vsa preskusna snov.

Uporabi se lahko katera koli metoda za mletje in presejanje, ki ustreza merilom kakovosti.

Pred pripravo zmesi se snov posuši pri 105 °C do konstantne mase. Če je temperatura razgradnje preskusne snovi nižja od 105 °C, je treba snov posušiti pri ustrezni nižji temperaturi.

1.6.1.2 *Gorljiva snov*

Kot gorljiva snov se uporabi uprašena celuloza. Izbrati je treba vrsto celuloze, ki se uporablja za tenkoplastno kromatografijo ali kolonsko kromatografijo. Izkazalo se je, da je primerna celuloza z več kakor 85 % vlaken z dolžino med 0,020 in 0,075 mm. Celulozni prah se preseje skozi sito z odprtinami velikosti 0,125 mm. V celem preskusu je treba uporabiti celulozo iz iste serije.

Pred pripravo zmesi se uprašena celuloza posuši pri 105 °C do konstantne mase.

Če se v predhodnem preskusu uporabi žagovina, se pripravi žagovina mehkega lesa, tako da se zbere delež, presejan skozi sito z odprtinami velikosti 1,6 mm, se temeljito premeša in nato štiri ure suši pri 105 °C v plasti, debeli največ 25 mm. Žagovina se ohladi in hrani v čim bolj polni nepredušno zaprti posodi do uporabe, kar naj bo po možnosti v 24 urah po sušenju.

1.6.1.3 *Vir vžiga*

Kot vir vžiga se uporabi vroč plamen plinskega gorilnika (premer najmanj 5 mm). Če se uporabi kak drug vir vžiga (npr. pri preskušanju v inertni atmosferi), ga je treba opisati v poročilu in utemeljiti njegovo uporabo.

1.6.2 **Izvedba preskusa**

Opomba:

Zmesi oksidantov in celuloze ali žagovine je treba obravnavati kot morebitno eksplozivne in z njimi ravnati z ustrezno previdnostjo.

1.6.2.1 *Predhodni preskus*

Posušena snov se temeljito zmeša s posušeno celulozo ali žagovino v razmerju 2 utežna dela preskusne snovi in 1 utežni del celuloze ali žagovine, nato se zmes oblikuje v majhen stožčast kupček z dimenzijami 3,5 cm (premer osnovne ploskve) × 2,5 cm (višina), tako da se brez tlačenja napolni stožčast kalup (npr. laboratorijski stekleni lij z zamašeno odtočno cevko).

▼B

Kupček se da na hladno, negorljivo, neporozno in toplotno slabo prevodno osnovno ploščo. Preskus je treba izvesti v digestoriju, kakor v 1.6.2.2.

Z virom vžiga se dotaknemo kupčka. Opazujeta in zapišeta se silovitost in trajanje nastale reakcije.

Če je reakcija silovita, se šteje, da je snov oksidativna.

Kadar koli je rezultat dvomljiv, je treba izvesti spodaj opisani popolni preskusni postopek.

1.6.2.2 *Popolni preskus*

Pripravijo se zmesi oksidanta in celuloze, ki vsebujejo od 10 do 90 utežnih % oksidanta, vsaka za 10 % več. Pri mejnih primerih je treba uporabiti tudi vmesne koncentracije zmesi oksidanta in celuloze, da se največja hitrost gorenja določi natančneje.

S pomočjo kalupa se oblikuje kupček. Kalup je narejen iz kovine, dolg 250 mm ter ima trikotni prečni prerez z notranjo višino 10 mm in notranjo širino 20 mm. Na obe vzdolžni stranici kalupa je pritrjena kovinska plošča, kot stranska pregrada, ki sega 2 mm nad gornji rob trikotnega prečnega prereza (slika). Ta priprava se napolni z zmesjo v majhnem presežku. Kalup se enkrat spusti z višine 2 cm na trdno podlago, nato se presežek snovi postrga s ploščico v poševnem položaju. Snameta se stranski pregradi, preostali prah pa zgladi z valjčkom. Na vrh kalupa se položi osnovna plošča iz negorljivega, neporoznega in toplotno slabo prevodnega materiala, nato se cela priprava obrne za 180° in odstrani kalup.

Kupček se namesti v digestorij, prečno na tok zraka.

Hitrost odvajanja zraka mora biti zadostna, da dim ne uhaja v laboratorij, in se med preskusom ne sme spreminjati. Okrog aparature je treba namestiti zaslon, za zaščito pred prepihom.

Zaradi higroskopičnosti celuloze in nekaterih preskusnih snovi je treba preskus izvesti čim hitreje.

Prižgemo en konec kupčka, tako da se ga dotaknemo s plamenom.

Ko reakcijsko območje preide začetno razdaljo 30 mm se meri reakcijski čas prek razdalje 200 mm.

Preskus se izvede z referenčno snovjo in vsaj po enkrat z vsako od zmesi preskusne snovi in celuloze.

Če je največja hitrost gorenja znatno večja od hitrosti gorenja referenčne zmesi, se preskus lahko ustavi; sicer je treba preskus petkrat ponoviti z vsako od treh zmesi, pri katerih je bila hitrost gorenja največja.

▼B

Če se sumi, da je rezultat lažno pozitiven, je treba preskus ponoviti z inertno snovjo s podobno velikostjo delcev, kakršna je diatomejska zemlja, namesto celuloze. Druga možnost je, da se zmes preskusne snovi in celuloze z največjo hitrostjo gorenja ponovno preskusi v inertni atmosferi (vsebnost kisika < 2 % v/v).

2. **PODATKI**

Zaradi varnosti se za značilno oksidativno lastnost preskusne snovi šteje največja hitrost gorenja – ne srednja vrednost.

Za vrednotenje je pomembna največja vrednost hitrosti gorenja dane zmesi v nizu šestih preskusov.

Izdela se graf največje vrednosti hitrosti gorenja vsake zmesi v odvisnosti od koncentracije oksidanta. Iz grafa se določi največja hitrost gorenja.

Šest izmerjenih vrednosti hitrosti gorenja v enem nizu preskusov na zmesi z največjo hitrostjo gorenja se ne sme razlikovati od aritmetične sredine za več kot 10 %; sicer je treba izboljšati metodi mletja in mešanja.

Dobljena največja hitrost gorenja se primerja z največjo hitrostjo gorenja referenčne zmesi (glej 1.3).

Če se preskusi izvajajo v inertni atmosferi, se največja hitrost reakcije primerja s hitrostjo reakcije referenčne zmesi v inertni atmosferi.

3. **POROČILO**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— identiteta, sestava, čistost, vsebnost vlage itd., preskusne snovi,

— kakršna koli obdelava vzorca (npr. mletje, sušenje …),

— v preskusih uporabljeni vir vžiga,

— rezultati meritev,

— način reagiranja (npr. hitro gorenje na površini, gorenje skozi celotno maso, kakršne koli informacije o produktih izgorevanja …),

— vse dodatne opombe, pomembne za razlago rezultatov, vključno z opisom silovitosti (plamenenje, iskrenje, dimljenje, počasno tlenje itd.) in približno trajanje, ugotovljeno v predhodnih varnostnih/presejalnih preskusih za preskusno in referenčno snov,

— rezultati preskusov z inertno snovjo, če so bili izvedeni,

— rezultati preskusov v inertni atmosferi, če so bili izvedeni.

▼B

3.2 RAZLAGA REZULTATA

Šteje se, da je snov oksidativna, kadar:

(a) je v predhodnem preskusu nastala silovita reakcija;

(b) je v popolnem preskusu največja hitrost gorenja preskušenih zmesi večja ali enaka največji hitrosti referenčne zmesi celuloze in barijevega nitrata.

Da se izognemo lažno pozitivnim rezultatom, je treba pri razlagi rezultatov upoštevati tudi rezultate, dobljene pri preskušanju snovi, zmešane z inertnim materialom, in/ali pri preskušanju v inertni atmosferi.

4. **VIRI**

NF T 20-035 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

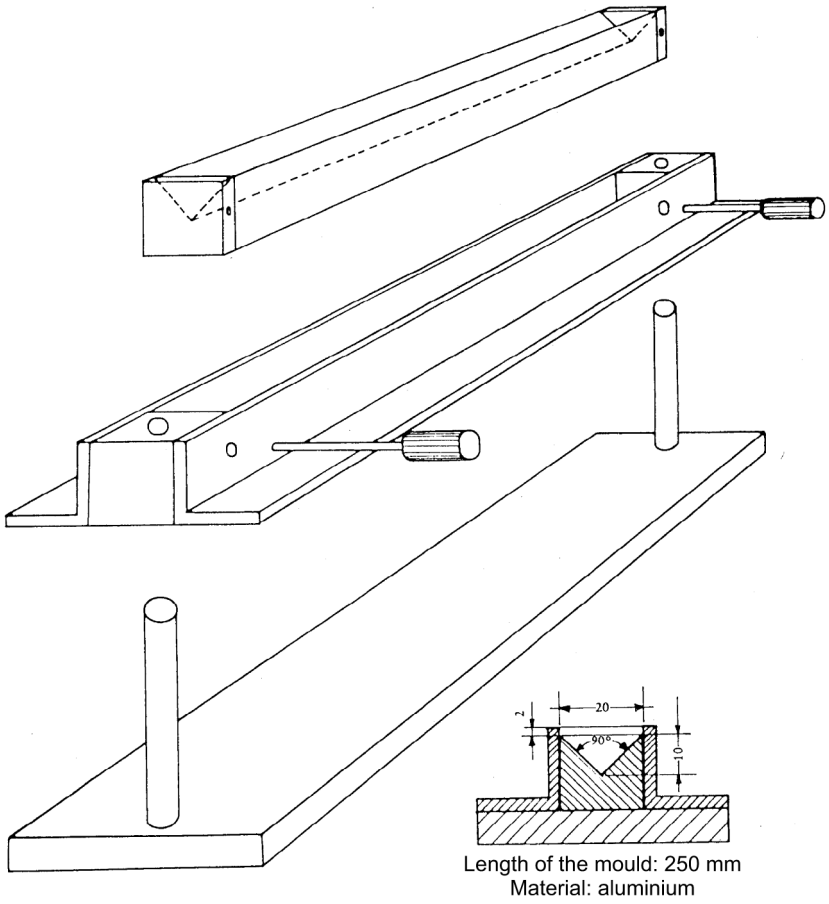
▼B

Dodatek

Slika

Kalup in pripomočki za pripravo kupčka

(Vse dimenzije so v milimetrih)



▼B

A.18 **POVPREČNO ŠTEVILO MOLEKULSKE MASE IN PORAZDELITEV MOLEKULSKE MASE POLIMEROV**

1. **METODA**

Ta metoda gelske permeacijske kromatografije je posnetek OECD smernice 118 (1996). Temeljna načela in nadaljnje tehnične informacije so navedene v literaturi 1.

1.1 UVOD

Ker so lastnosti polimerov tako raznolike, je nemogoče opisati eno samo metodo, s katero bi bili natančno določeni pogoji za separacijo in ocenjevanje, ki bi pokrivali vse možnosti in posebnosti, do katerih pride pri separaciji polimerov. Zlasti se gelni permeacijski kromatografiji (GPC) pogosto ne da podrediti kompleksnih sistemov polimerov. Kadar GPC metode ni mogoče uporabiti, lahko molekulsko maso določimo s pomočjo drugih metod (glej Prilogo). V takšnih primerih je treba uporabljeno metodo natančno obrazložiti in utemeljiti.

Opisana metoda temelji na DIN standardu 55672 (1). Ta DIN standard vsebuje podrobne informacije o načinu izvajanja poskusov in ocenjevanja podatkov. V primeru, da je treba pogoje poskusa spremeniti, je treba takšne spremembe utemeljiti. Lahko uporabimo tudi druge standarde, če so v celoti podprti z viri. Opisana metoda uporablja vzorce polistirena znane polidisperznosti za kalibriranje in jo bo mogoče treba spremeniti, da bo ustrezala določenim polimerom, npr. v vodi topnim polimerom in razvejanim polimerom z dolgimi verigami.

1.2 DEFINICIJE IN ENOTE

Povprečno število molekulske mase M_n in povprečno maso molekulske mase M_w določimo s pomočjo naslednjih enačb:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kjer je:

H_i stopnja signala detektorja od osnovne črte za retenzijski volumen V_i,

M_i molekulska masa frakcije polimera pri retenzijskem volumnu V_i in

n število podatkovnih točk.

Razpon porazdelitve molekulske mase, ki je mera za disperznost sistema, se kaže z razmerjem M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENČNE SNOVI

Ker je GPC relativna metoda, je treba opraviti kalibriranje. Običajno za to uporabimo ozko porazdeljene, linearno strukturirane vzorce polistirena z znanimi povprečnimi molekulskimi masami M_n in M_w in znano porazdelitvijo molekulske mase. Kalibracijsko krivuljo lahko uporabimo le pri določanju molekulske mase neznanega vzorca, če so pogoji za separacijo vzorca in standardov izbrani na povsem enak način.

Določeno razmerje med molekulsko maso in volumnom elucije je veljavno le pod specifičnimi pogoji posameznega poskusa. Ti pogoji vključujejo predvsem temperaturo, topilo (ali mešanico topila), kromatografske pogoje in separacijsko kolono ali sistem kolon.

Tako določene molekulske mase vzorca so relativne vrednosti in so opisane kot „ekvivalentne molekulske mase polistirena“. To pomeni, da se lahko glede na strukturalne in kemične razlike med vzorcem in standardi molekulske mase bolj ali manj oddaljijo od absolutnih vrednosti. Če uporabimo druge standarde, npr. polietilen glikol, polietilen oksid, polimetil metakrilat, poliakrilno kislino, je treba za to navesti razloge.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Porazdelitev molekulske mase vzorca in povprečno molekulsko maso (M_n, M_w) lahko določimo z uporabo GPC metode. GPC je poseben tip tekočinske kromatografije, kjer vzorec separiramo v skladu s hidrodinamičnimi volumni posameznih sestavin (2).

Separacija se izvede, ko vzorec preteče skozi kolono, napolnjeno s poroznim materialom, običajno z organskim gelom. Majhne molekule lahko predrejo skozi pore, večje molekule pa se izločijo. Pot večjih molekul je tako krajša in te so najprej eluirane. Srednje velike molekule predrejo skozi nekaj por in so eluirane pozneje. Najmanjše molekule, katerih povprečen hidrodinamični premer je manjši od por gela, lahko predrejo skozi vse pore. Te so eluirane zadnje.

V idealnih razmerah na separacijo v celoti vpliva velikost molekulskih vrst, vendar pa se v praksi težko izognemo vsaj nekaterim ovirajočim učinkom absorbcije. Neenakomerna napolnjenost kolon in mrtvi volumni lahko razmere poslabšajo (2).

Ugotavljanje izvedemo, na primer, na osnovi refrakcijskega indeksa ali UV absorpcije in dobimo preprosto distribucijsko krivuljo. Da pa bi na krivulji opredelili dejanske vrednosti molekulske mase, moramo kalibrirati kolono, tako da skoznjo pretečejo polimeri z znano molekulsko maso in, v idealnem primeru, v glavnem podobno strukturo, npr. različni standardi polistirena. Rezultat Gaussove krivulje, čeprav včasih popačen z majhnim repom na strani nizke molekulske mase, je običajno tak, da navpična os kaže količino, izraženo z maso, raznih eluiranih vrst molekulske mase, vodoravna os pa logaritem molekulske mase.

▼B

1.5 KRITERIJI KAKOVOSTI

Ponovljivost (Relativna standardna deviacija: RSD) volumna elucije bi morala preseči 0,3 %. Zahtevana ponovljivost analize mora biti zagotovljena s korekcijo prek internega standarda, če je kromatogram ocenjen v časovni odvisnosti in če ne ustreza zgoraj navedenem kriteriju (1). Polidisperznosti so odvisne od molekulskih mas standardov. V primeru standarda polistirena so tipične vrednosti naslednje:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je mulekulska masa standarda pri maksimumu vrha)

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Priprava standardnih raztopin polistirena**

Standardi polistirena se raztopijo s previdnim mešanjem v izbranem eluatu. Pri pripravi raztopin je treba upoštevati navodila proizvajalca.

Koncentracije izbranih standardov so odvisne od različnih dejavnikov, npr. injekcijski volumen, viskoznost raztopine in občutljivost analitskega detektorja. Maksimalen injekcijski volumen mora biti prilagojen dolžini kolone, da bi se izognili preobremenitvi. Tipični injekcijski volumni za analitične separacije pri uporabi GPC metode s kolono 30 cm × 7,8 mm so navadno med 40 in 100 µl. Možni so višji volumni, vendar ne smejo presegati 250 µl. Optimalno razmerje med injekcijskim volumnom in koncentracijo je treba določiti pred dejanskim kalibriranjem kolone.

1.6.2 **Priprava raztopine vzorca**

Načeloma veljajo za pripravo raztopin vzorca enake zahteve. Vzorec se raztopi v ustreznem topilu, npr. tetrahidrofuranu (THF), če ga previdno pretresemo. V nobenem primeru ga ne smemo raztopiti z uporabo ultrazvočne kopeli. Kadar je potrebno, se raztopina vzorca očisti skozi membranski filter z velikostjo por med 0,2 in 2 µm.

Prisotnost neraztopljenih delcev je treba zabeležiti v zaključnem poročilu, saj do tega lahko pride zaradi vrst visoke molekulske mase. Uporabiti je treba ustrezno metodo za določitev odstotka razgrajenih delcev po masi. Raztopine je treba uporabiti v 24 urah.

1.6.3 **Aparat**

— zbiralnik za topilo,

— digestorij (kjer je primerno),

— črpalka,

▼B

— blažilec tresljajev (kjer je primerno),

— injekcijski sistem,

— kromatografske kolone,

— detektor,

— merilec pretoka (kjer je primerno),

— snemalnik in obdelovalec podatkov,

— posoda za odpadke.

Zagotoviti je treba da je sistem GPC inerten v zvezi z uporabljenimi topili (npr. z uporabo jeklenih kapilar za topilo THF).

1.6.4 **Injekcijski sistem in sistem prenosa topila**

Določen volumen raztopine vzorca nanesemo na kolono bodisi z avtomatičnim vzorčevalcem bodisi ročno na natančno določeno mesto. Če pri ročnem nanosu konico brizgalke prehitro umaknemo ali pritisnemo, lahko povzročimo spremembe v ugotovljeni porazdelitvi molekulske mase. Sistem prenosa topila mora biti, kolikor je mogoče, brez tresljajev, zato je najbolje, če uporabimo blažilec tresljajev. Red stopnje pretoka je 1 ml/min.

1.6.5 **Kolona**

Polimer je opredeljen z uporabo bodisi preproste kolone bodisi več zaporedno povezanih kolon, odvisno od vzorca. V prodaji so na voljo številni porozni materiali kolon z opredeljenimi lastnostmi (npr. velikost por, meje izločanja). Izbor separacijskega gela ali dolžine kolone je odvisen tako od lastnosti vzorca (hidrodinamični volumni, porazdelitev molekulske mase) in specifičnih pogojev za separacijo, kot so topilo, temperatura in pretok (1) (2) (3).

1.6.6 **Teoretični platoji**

Kolona ali kombinacija kolon, uporabljenih za separacijo, mora biti opredeljen s številom teoretičnih platojev. V primeru THF kot elucijskega topila to vsebuje nanos raztopine etil benzena ali drugega ustreznega nepolarnega vzorca na kolono znane dolžine. Število teoretičnih platojev dobimo z naslednjo enačbo:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ali} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

kjer je

N = število teoretičnih platojev

V_e = elucijski volumen na maksimumu vrha

▼B

W = temelj širine vrha

$W_{1/2}$ = širina vrha na polovici višine

1.6.7 **Učinkovitost separacije**

Poleg števila teoretičnih platojev, ki predstavlja količino, ki določa širino traku, svojo vlogo igra tudi učinkovitost separacije, ki jo določa nagib kalibracijske krivulje. Učinkovitost separacije kolone dobimo iz naslednjega razmerja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{prečni prerez kolone}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kjer je:

$V_{e,\ Mx}$ = elucijski volumen za polistiren z molekulsko maso M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = elucijski volumen za polistiren z 10 krat večjo molekulsko maso

Resolucijo sistema običajno opredelimo na naslednji način:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kjer sta:

V_{e1}, V_{e2} = elucijska volumna dveh standardov polistirena na maksimumu vrha

W_1, W_2 = širini vrha pri osnovni črti

M_1, M_2 = molekulski masi pri maksimumu vrha (naj se razlikujeta s faktorjem 10).

R-vrednost sistema kolone mora biti večja od 1, 7 (4).

1.6.8 **Topila**

Vsa topila morajo biti visoke čistosti (za THF se uporablja čistost 99,5 %). Zbiralnik za topilo (če je potreben v inertnem plinskem ozračju) mora biti dovolj velik za kalibriranje kolon in nekaj analiz vzorca. Topilo je treba razpliniti preden ga s črpalko prenesemo na kolono.

1.6.9 **Nadzor temperature**

Temperatura kritičnih internih sestavin (injekcijski zvitek, kolone, detektor in cevovod) mora biti konstantna in v skladu z izbranim topilom.

▼B

1.6.10 **Detektor**

Namen detektorja je količinsko beleženje koncentracije iz kolone eluiranega vzorca. Da bi se izognili nepotrebni širitvi vrhov, mora kivetni volumen detektorske celice ostati čim manjši. Razen v primeru disperzije svetlobe in detektorjev viskoznosti ne sme presegati 10 µl. Za detekcijo se navadno uporablja diferencialna refraktometrija. Vendar pa, če to zahtevajo specifične lastnosti vzorca ali elucijskega topila, je mogoče uporabiti tudi druge tipe detektorjev, npr. UV/VIS, IR, detektorje viskoznosti, itd.

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 PODATKI

Za podrobne ocenjevalne kriterije kot tudi za zahteve, ki se nanašajo na zbiranje in obdelavo podatkov, se je treba sklicevati na DIN standard (1).

Za vsak vzorec je treba opraviti dva samostojna poskusa. Analizirati je treba vsakega posebej.

Za vsako meritev je treba določiti M_n, M_w, M_w/M_n in M_p. Potrebno je eksplicitno označiti, da so merjene vrednosti relativne vrednosti, ekvivalentne molekulskim masam uporabljenega standarda.

Po določitvi retenzijskih volumnov ali retenzijskih časov (po možnosti popravljenih z uporabo internega standarda), se logaritem M_p vrednosti (kjer je M_p maskimum vrha kalibracijskega standarda) prikažejo ob eni izmed teh količin. Najmanj dve kalibracijski točki sta potrebni za dekado molekulske mase, najmanj pet meritvenih točk pa je zahtevanih za celotno krivuljo, ki bi morala pokrivati ocenjeno molekulsko maso vzorca. Končno točko nizke molekulske mase na kalibracijski krivulji določa n-heksil benzen ali katera drug ustrezen nepolaren vzorec. Povprečno število in povprečno maso molekulskih mas navadno določimo s pomočjo elektronske obdelave podatkov, ki temelji na enačbah iz oddelka 1.2. V primeru ročne digitalizacije, se lahko upošteva ASTM D 3536-91 (3).

Porazdelitvena krivulja mora biti posredovana v obliki tabele ali grafa (diferencialna frekvenca ali odstotek vsot proti logaritmu M). V grafičnem prikazu mora biti normalna širina ene dekade molekulske mase 4 cm, maksimum vrha pa naj sega približno 8 cm v višino. V primeru integralnih porazdelitvenih krivulj mora biti razlika na ordinati med 0 in 100 % približno 10 cm.

2.2 PRESKUSNO POROČILO

Preskusno poročilo mora vsebovati naslednje informacije:

2.2.1 **Preskusna snov**

— razpoložljive informacije o preskusni snovi (identiteta, aditivi, nečistote),

▼B

— opis obdelave vzorca, ugotovitve, problemi.

2.2.2 **Inštrumenti**

— zbiralnik za eluat, inertni plin, razplinjanje eluata, sestava eluata, nečistote,

— črpalka, blažilec tresljajev, injekcijski sistem,

— separacijske kolone (proizvajalec, vse informacije o značilnostih kolon, kot so velikost por, vrsta separacije, material, itd., število, dolžina in zaporedje uporabljenih kolon),

— število teoretičnih platojev kolone (ali kombinacije), učinkovitost separacije (resolucija sistema),

— informacije o simetriji vrhov,

— temperatura kolone, vrste nadzora temperature,

— detektor (principi merjenja, tip, volumen kivete),

— merilec pretoka, če je uporabljen (proizvajalec, principi merjenja),

— sistem zapisovanja in obdelovanja podatkov (strojna in programska oprema).

2.2.3 **Kalibriranje sistema**

— podroben opis metode, uporabljene za sestavo kalibracijske krivulje,

— informacije o kriterijih kakovosti za to metodo (npr. korelacijski koeficient, vsota kvadratov odstopanj, itd.),

— informacije o vseh ekstrapolacijah, domnevah in približevanjih, opravljenih med poskusnim postopkom in ocenitev ter obdelava podatkov,

— vse uporabljene meritve za ustvarjanje kalibracijske krivulje morajo biti dokumentirane na tabeli, ki vsebuje naslednje informacije za vsako kalibracijsko točko:

  — ime vzorca,

  — proizvajalec vzorca,

  — značilne vrednosti standardov M_p, M_n, M_w in M_w/M_n, kot jih posreduje proizvajalec, ali kot so izpeljane iz naknadnih meritev, skupaj s podrobnostmi o metodi določanja,

  — injekcijski volumen in injekcijska koncentracija,

▼B

— M_p vrednost, uporabljena za kalibriranje,

— elucijski volumen ali popravljeni retenzijski čas, izmerjen pri maksimumih vrha,

— M_p, izračunan na maksimumu vrha,

— odstotek odstopanja od izračunanega $M_p$in kalibracijska vrednost.

2.2.4 **Ocenjevanje**

— ocena na časovni podlagi: metode, uporabljene za zagotovitev zahtevane obnovljivosti (metode popravljanja, interni standard, itd.),

— informacije o tem, ali je ocena izvedena na podlagi elucijskega volumna ali retenzijskega časa,

— informacije o mejah ocenjevanja, če vrh ni analiziran v celoti,

— opis blažilnih metod, če so uporabljene,

— postopki priprave in predobdelave vzorca,

— prisotnost morebitnih neraztopljenih delcev,

— injekcijski volumen (µl) in injekcijska koncentracija (mg/µl),

— ugotovitve, ki kažejo na učinke, ki peljejo k odklonom od idealnega GPC profila,

— podroben opis vseh sprememb v preskusnih postopkih,

— podrobnosti o stopnjah odstopanj,

— vse druge informacije in ugotovitve, ki so pomembne za razlago rezultatov.

3. **VIRI**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size – Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Priloga

Primeri drugih metod za določanje povprečnega števila molekulske mase (Mn) za polimere

Gelska permeacijska kromatografija (GPC) je priljubljena metoda za določanje M_n, zlasti kadar je na razpolago niz standardov, katerih struktura je primerljiva s strukturo polimera. Vendar pa v primeru, kadar naletimo pri uporabi metode GPC na izvedbene težave ali kadar lahko pričakujemo, da snov ne bo izpolnila regularnega M_n kriterija (in ki ga je potrebno potrditi), so na razpolago druge metode, kot so:

1. **Uporaba koligativnih lastnosti**

1.1 Ebulioskopija/krioskopija

vključuje meritev zvišanja vrelišča (ebulioskopija) ali znižanja strdišča (krioskopija) topila ob dodajanju polimera. Metoda se zanaša na dejstvo, da je učinek raztopljenega polimera na točki vrelišča/strdišča tekočine odvisen od molekulske mase polimera (1) (2).

Nanos: $M_n < 20\,000$.

1.2 Nižanje pritiska hlapov

vključuje meritev pritiska hlapov izbrane referenčne tekočine pred in po dodajanju znanih količin polimera (1) (2).

Nanos: $M_n < 20\,000$ (teoretično; v praksi gre za mejno vrednost).

1.3 Membranska osmometrija

se zanaša na osmozo, t.j. naravno nagnjenost raztapljajočih se molekul, da predrejo skozi polprepustno membrano iz razredčila v koncentrirano raztopino, da bi se doseglo ravnovesje. V preskusu je razredčena raztopina na nični koncentraciji, medtem ko koncentrirana raztopina vsebuje polimer. Učinek prehajanja topila skozi membrano povzroča diferencial pritiska, ki je odvisen od koncentracije in molekulske mase polimera (1) (3) (4).

Nanos: M_n med 20 000–200 000.

1.4 Osmometrija v hlapni fazi

vključuje primerjavo stopnje hlapenja čistega raztopljenega aerosola na najmanj tri aerosole, ki vsebujejo polimer na različnih koncentracijah (1) (5) (6).

Nanos: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analiza končnih skupin**

Da bi uporabili to metodo, sta potrebna tako celotna struktura polimera in narava verige, ki zaključuje končne skupine (ta se mora razlikovati od glavnega ogrodja po, na primer, NMR ali titriranju/derivatizaciji). Z določitvijo molekulske koncentracije končnih skupin, prisotnih na polimeru, lahko pridemo do vrednosti molekulske mase (7) (8) (9).

Nanos: M_n do 50 000 (z naraščajočo zanesljivostjo).

3. **Literatura**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25–52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139–2146.

▼B

A.19 **VSEBNOST POLIMEROV NIZKE MOLEKULSKE MASE**

1. **METODA**

Ta gelska permeacijska kromatografija metoda je posnetek OECD smernice 119 (1996). Temeljna načela in nadaljnje tehnične informacije so navedene v literaturi 1.

1.1 UVOD

Ker so lastnosti polimerov tako raznolike, je nemogoče opisati eno samo metodo, s katero bi bili natančno določeni pogoji za separacijo in ocenjevanje, ki bi pokrivali vse možnosti in posebnosti, do katerih pride pri separaciji polimerov. Zlasti se gelski permeacijski kromatografiji (GPC) pogosto ne da podrediti kompleksnih sistemov polimerov. Kadar GPC metode ni mogoče uporabiti, lahko molekulsko maso določimo s pomočjo drugih metod (glej Prilogo). V takšnih primerih je treba uporabljeno metodo natančno obrazložiti in utemeljiti.

Opisana metoda temelji na DIN standardu 55672 (1). Ta DIN standard vsebuje podrobne informacije o načinu izvajanja poskusov in ocenjevanja podatkov. V primeru, da je treba pogoje poskusa spremeniti, je treba takšne spremembe utemeljiti. Lahko uporabimo tudi druge standarde, če so v celoti podprti z viri. Opisana metoda uporablja vzorce polistirena znane polidisperznosti za kalibriranje in jo bo mogoče treba spremeniti, da bo ustrezala določenim polimerom, npr. v vodi topnim polimerom in razvejanim polimerom z dolgimi verigami.

1.2 DEFINICIJE IN ENOTE

Nizka molekulska masa je arbitrarno opredeljena kot molekulska masa pod 1 000 daltoni.

Povprečno število molekulske mase M_n in povprečno maso molekulske mase M_w določimo s pomočjo naslednjih enačb:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kjer je

H_I = stopnja signala detektorja od osnovne črte za retenzijski volumen V_i

M_i = molekulska masa frakcije polimera pri retenzijskem volumnu V_i in n število podatkovnih točk.

Razpon porazdelitve molekulske mase, ki je mera za disperznost sistema, se kaže z razmerjem M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENČNE SNOVI

Ker je GPC relativna metoda, je treba opraviti kalibriranje. Običajno za to uporabimo ozko porazdeljene, linearno strukturirane vzorce polistirena z znanimi povprečnimi molekulskimi masami M_n in M_w in znano porazdelitvijo molekulske mase. Kalibracijsko krivuljo lahko uporabimo le pri določanju molekulske mase neznanega vzorca, če so pogoji za separacijo vzorca in standardov izbrani na povsem enak način.

Določeno razmerje med molekulsko maso in volumnom elucije je veljavno le pod specifičnimi pogoji posameznega poskusa. Ti pogoji vključujejo predvsem temperaturo, topilo (ali mešanico topila), kromatografske pogoje in separacijsko kolono ali sistem kolon.

Tako določene molekulske mase vzorca so relativne vrednosti in so opisane kot „ekvivalentne molekulske mase polistirena“. To pomeni, da se lahko glede na strukturalne in kemične razlike med vzorcem in standardi molekulske mase bolj ali manj oddaljijo od absolutnih vrednosti. Če uporabimo druge standarde, npr. polietilen glikol, polietilen oksid, polimetil metakrilat, poliakrilno kislino, je treba za to navesti razloge.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Porazdelitev molekulske mase vzorca in povprečno molekulsko maso (M_n, M_w) lahko določimo z uporabo GPC metode. GPC je poseben tip tekočinske kromatografije, kjer vzorec separiramo v skladu s hidrodinamičnimi volumni posameznih sestavin (2).

Separacija se izvede, ko vzorec preteče skozi kolono, napolnjeno s poroznim materialom, običajno z organskim gelom. Majhne molekule lahko predrejo skozi pore, večje molekule pa se izločijo. Pot večjih molekul je tako krajša in te so najprej eluirane. Srednje velike molekule predrejo skozi nekaj por in so eluirane pozneje. Najmanjše molekule, katerih povprečen hidrodinamični premer je manjši od por gela, lahko predrejo skozi vse pore. Te so eluirane zadnje.

V idealnih razmerah na separacijo v celoti vpliva velikost molekulskih vrst, vendar pa se v praksi težko izognemo vsaj nekaterim oviraj očim učinkom absorbcije. Neenakomerna napolnjenost kolon in mrtvi volumni lahko razmere poslabšajo (2).

Ugotavljanje izvedemo, npr., na osnovi refrakcijskega indeksa ali UV absorpcije in dobimo preprosto distribucijsko krivuljo. Da pa bi na krivulji opredelili dejanske vrednosti molekulske mase, moramo kalibrirati kolono, tako da skoznjo pretečejo polimeri z znano molekulsko maso in, v idealnem primeru, v glavnem podobno strukturo, npr. različni standardi polistirena. Rezultat Gaussove krivulje, čeprav včasih popačen z majhnim repom na strani nizke molekulske mase, je običajno tak, da navpična os kaže količino, izraženo z maso, raznih eluiranih vrst molekulske mase, vodoravna os pa logaritem molekulske mase.

▼B

Vsebnost nizke molekulske mase izhaja iz te krivulje. Izračun je lahko točen le, če se vrste z nizko molekulsko maso ekvivalentno na osnovi mase odzivajo na polimer kot celota.

1.5 KRITERIJI KAKOVOSTI

Ponovljivost (Relativna standardna deviacija: RSD) volumna elucije bi morala preseči 0,3 %. Zahtevana ponovljivost analize mora biti zagotovljena s korekcijo prek internega standarda, če je kromatogram ocenjen v časovni odvisnosti in če ne ustreza zgoraj navedenem kriteriju (1). Polidisperznosti so odvisne od molekulskih mas standardov. V primeru standarda polistirena so tipične vrednosti naslednje:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulska masa standarda pri maksimumu vrha)

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Priprava standardnih raztopin polistirena**

Standardi polistirena se raztopijo s previdnim mešanjem v izbranem eluatu. Pri pripravi raztopin je treba upoštevati navodila proizvajalca.

Koncentracije izbranih standardov so odvisne od različnih dejavnikov, npr. injekcijski volumen, viskoznost raztopine in občutljivost analitskega detektorja. Maksimalen injekcijski volumen mora biti prilagojen dolžini kolone, da bi se izognili preobremenitvi. Tipični injekcijski volumni za analitične separacije pri uporabi GPC metode s kolono 30 cm × 7,8 mm so navadno med 40 in 100 µl. Možni so višji volumni, vendar ne smejo presegati 250 µl. Optimalno razmerje med injekcijskim volumnom in koncentracijo je treba določiti pred dejanskim kalibriranjem kolone.

1.6.2 **Priprava raztopine vzorca**

Načeloma veljajo za pripravo raztopin vzorca enake zahteve. Vzorec se raztopi v ustreznem topilu, npr. tetrahidrofuranu (THF), če ga previdno pretresemo. V nobenem primeru ga ne smemo raztopiti z uporabo ultrazvočne kopeli. Kadar je potrebno, se raztopina vzorca očisti skozi membranski filter z velikostjo por med 0,2 in 2 µm.

Prisotnost neraztopljenih delcev je treba zabeležiti v zaključnem poročilu, saj do tega lahko pride zaradi vrst visoke molekulske mase. Uporabiti je treba ustrezno metodo za določitev odstotka razgrajenih delcev po masi. Raztopine je treba uporabiti v 24 urah.

▼B

1.6.3 **Korekcija vsebnosti nečistot in aditivov**

Ponavadi je nujno opraviti korekcijo vsebnosti vrst z M < 1 000 za prispevek prisotnih nepolimerskih specifičnih sestavin (npr. nečistote in/ali aditivi), razen če je izmerjena vsebnost že < 1 %. To izvedemo z direktno analizo polimerske raztopine ali GPC eluata.

V primerih, kadar je eluat pri prehajanju skozi kolono preveč razredčen za nadaljnjo analizo, ga je treba koncentrirati. Mogoče bo potrebno izhlapeti eluat do suhega stanja in ga še enkrat raztopiti. Koncentriranje eluata se mora izvesti v pogojih, ki zagotavljajo, da na eluatu ne pride do nikakršnih sprememb. Tretiranje eluata po opravljeni GPC je odvisno od analitične metode, uporabljene za kvantitativno določitev.

1.6.4 **Aparat**

GPC aparat vsebuje naslednje komparente:

— zbiralnik za topilo,

— digestorij (kjer je primerno),

— črpalka,

— blažilec tresljajev (kjer je primerno),

— injekcijski sistem,

— kromatografske kolone,

— detektor,

— merilec pretoka (kjer je primerno),

— snemalnik in obdelovalec podatkov,

— posoda za odpadke.

Zagotoviti je treba da je sistem GPC inerten v zvezi z uporabljenimi topili (npr. z uporabo jeklenih kapilar za topilo THF).

1.6.5 **Injekcijski sistem in sistem prenosa topila**

Določen volumen raztopine vzorca nanesemo na kolono bodisi z avtomatičnim vzorčevalcem bodisi ročno na natančno določeno mesto. Če pri ročnem nanosu konico brizgalke prehitro umaknemo ali pritisnemo, lahko povzročimo spremembe v ugotovljeni porazdelitvi molekulske mase. Sistem prenosa topila mora biti, kolikor je mogoče, brez tresljajev, zato je najbolje, če uporabimo blažilec tresljajev. Red stopnje pretoka je 1 ml/min.

1.6.6 **Kolona**

Polimer je opredeljen z uporabo bodisi preproste kolone bodisi več zaporedno povezanih kolon, odvisno od vzorca. V prodaji so na voljo številni porozni materiali kolon z opredeljenimi lastnostmi (npr. velikost por, meje izločanja). Izbor separacijskega gela ali dolžine kolone je odvisen tako od lastnosti vzorca (hidrodinamični volumni, porazdelitev molekulske mase) in specifičnih pogojev za separacijo, kot so topilo, temperatura in pretok (1) (2) (3).

▼B

1.6.7 **Teoretični platoji**

Kolona ali kombinacija kolon, uporabljenih za separacijo, mora biti opredeljen s številom teoretičnih platojev. V primeru THF kot elucijskega topila to vsebuje nanos raztopine etil benzena ali drugega ustreznega nepolarnega vzorca na kolono znane dolžine. Število teoretičnih platojev dobimo z naslednjo enačbo:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{ali} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

kjer je

N = število teoretičnih platojev

V_e = elucijski volumen na maksimumu vrha

W = temelj širine vrha

$W_{1/2}$ = širina vrha na polovici višine

1.6.8 **Učinkovitost separacije**

Poleg števila teoretičnih platojev, ki predstavlja količino, ki določa širino traku, svojo vlogo igra tudi učinkovitost separacije, ki jo določa nagib kalibracijske krivulje. Učinkovitost separacije kolone dobimo iz naslednjega razmerja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{prečni preres kolone}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kjer je:

$V_{e,\ Mx}$ = elucijski volumen za polistiren z molekulsko maso M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = elucijski volumen za polistiren z 10 krat večjo molekulsko maso

Resolucijo sistema običajno opredelimo na naslednji način:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kjer sta:

V_{e1}, V_{e2} = elucijska volumna dveh standardov polistirena na maksimumu vrha

W_1, W_2 = širini vrha pri osnovni črti

M_1, M_2 = molekulski masi pri maksimumu vrha (naj se razlikujeta s faktorjem 10).

R-vrednost sistema kolone mora biti večja od 1,7 (4).

▼B

1.6.9 **Topila**

Vsa topila morajo biti visoke čistosti (za THF se uporablja čistost 99,5 %). Zbiralnik za topilo (če je potreben v inertnem plinskem ozračju) mora biti dovolj velik za kalibriranje kolon in nekaj analiz vzorca. Topilo je treba razpliniti preden ga s črpalko prenesemo na kolono.

1.6.10 **Nadzor temperature**

Temperatura kritičnih internih sestavin (injekcijski zvitek, kolone, detektor in cevovod) mora biti konstantna in v skladu z izbranim topilom.

1.6.11 **Detektor**

Namen detektorja je količinsko beleženje koncentracije iz kolone eluiranega vzorca. Da bi se izognili nepotrebni širitvi vrhov, mora kivetni volumen detektorske celice ostati čim manjši. Razen v primeru disperzije svetlobe in detektorjev viskoznosti ne sme presegati 10 μ l. Za detekcijo se navadno uporablja diferencialna refraktometrija. Vendar pa, če to zahtevajo specifične lastnosti vzorca ali elucijskega topila, je mogoče uporabiti tudi druge tipe detektorjev, npr. UV/VIS, IR, detektorje viskoznosti, itd.

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 PODATKI

Za podrobne ocenjevalne kriterije kot tudi za zahteve, ki se nanašajo na zbiranje in obdelavo podatkov, se je treba sklicevati na DIN standard (1).

Za vsak vzorec je treba opraviti dva samostojna poskusa. Analizirati je treba vsakega posebej. V vseh primerih je bistveno, da določimo tudi podatke iz praznih polj, s katerimi smo ravnali v enakih pogojih kot vzorec.

Potrebno je eksplicitno označiti, da so merjene vrednosti relativne vrednosti, ekvivalentne molekulskim masam uporabljenega standarda.

Po določitvi retenzijskih volumnov ali retenzijskih časov (po možnosti popravljenih z uporabo internega standarda), se logaritem M_p vrednosti (kjer je M_p maksimum vrha kalibracijskega standarda) prikažejo ob eni izmed teh količin. Najmanj dve kalibracijski točki sta potrebni za dekado molekulske mase, najmanj pet meritvenih točk pa je zahtevanih za celotno krivuljo, ki bi morala pokrivati ocenjeno molekulsko maso vzorca. Končno točko nizke molekulske mase na kalibracijski krivulji določa n-heksil benzen ali kateri drug ustrezen nepolaren vzorec. Povprečno število in povprečno maso molekulskih mas navadno določimo s pomočjo elektronske obdelave podatkov, ki temelji na enačbah iz oddelka 1.2. V primeru ročne digitalizacije, se lahko upošteva ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Če na koloni ostane kak netopen polimer, bo njegova molekulska masa verjetno višja od mase topne frakcije; v kolikor je ne bi upoštevali, bi to lahko pripeljalo do previsoke ocene vsebnosti nizke molekulske mase. Smernice za korekcijo vsebnosti nizke molekulske mase za netopen polimer se nahajajo v Prilogi.

Porazdelitvena krivulja mora biti posredovana v obliki tabele ali grafa (diferencialna frekvenca ali odstotek vsot proti logaritmu M). V grafičnem prikazu mora biti normalna širina ene dekade molekulske mase 4 cm, maksimum vrha pa naj sega približno 8 cm v višino. V primeru integralnih porazdelitvenih krivulj mora biti razlika na ordinati med 0 in 100 % približno 10 cm.

2.2 PRESKUSNO POROČILO

Preskusno poročilo mora vsebovati naslednje informacije:

2.2.1 **Preskusna snov**

— razpoložljive informacije o preskusni snovi (identiteta, aditivi, nečistote),

— opis obdelave vzorca, ugotovitve, problemi.

2.2.2 **Inštrumenti**

— zbiralnik za eluat, inertni plin, razplinjanje eluata, sestava eluata, nečistote,

— črpalka, blažilec tresljajev, injekcijski sistem,

— separacijske kolone (proizvajalec, vse informacije o značilnostih kolon, kot so velikost por, vrsta separacije, material, itd., število, dolžina in zaporedje uporabljenih kolon),

— število teoretičnih platojev kolone (ali kombinacije), učinkovitost separacije(resolucija sistema),

— informacije o simetriji vrhov,

— temperatura kolone, vrste nadzora temperature,

— detektor (principi merjenja, tip, volumen kivete),

— merilec pretoka, če je uporabljen (proizvajalec, principi merjenja),

— sistem zapisovanja in obdelovanja podatkov (strojna in programska oprema).

2.2.3 **Kalibriranje sistema**

— podroben opis metode, uporabljene za sestavo kalibracijske krivulje,

▼B

— informacije o kriterijih kakovosti za to metodo (npr. korelacijski koeficient, vsota kvadratov odstopanj, itd.),

— informacije o vseh ekstrapolacijah, domnevah in približevanjih, opravljenih med poskusnim postopkom in ocenitev ter obdelava podatkov,

— vse uporabljene meritve za ustvarjanje kalibracijske krivulje morajo biti dokumentirane na tabeli, ki vsebuje naslednje informacije za vsako kalibracijsko točko:

  — ime vzorca,

  — proizvajalec vzorca,

  — značilne vrednosti standardov M_p, M_n, M_w in M_w/M_n, kot jih posreduje proizvajalec, ali kot so izpeljane iz naknadnih meritev, skupaj s podrobnostmi o metodi določanja,

  — injekcijski volumen in injekcijska koncentracija,

  — M_p vrednost, uporabljena za kalibriranje,

  — elucijski volumen ali popravljeni retenzijski čas, izmerjen pri maksimumih vrha,

  — M_p, izračunan na maksimumu vrha,

  — odstotek odstopanja od izračunanega $M_p$in kalibracijska vrednost.

2.2.4 **Informacije o vsebnosti nizke molekulske mase**

— opis uporabljenih metod pri analizi in način izvedbe poskusov,

— informacije o odstotkih vsebnosti vrst nizke molekulske mase (w/w), ki se nanaša na celotni vzorec,

— informacije o nečistotah, aditivih in drugih nepolimerskih vrstah v odstotkih po teži, ki se nanašajo na celoten vzorec.

2.2.5 **Ocenjevanje**

— ocena na časovni podlagi: metode, uporabljene za zagotovitev zahtevane obnovljivosti (metode popravljanja, interni standard, itd.),

— informacije o tem, ali je ocena izvedena na podlagi elucijskega volumna aliretenzijskega časa,

— informacije o mejah ocenjevanja, če vrh ni analiziran v celoti,

— opis blažilnih metod, če so uporabljene,

— postopki priprave in predobdelave vzorca,

— prisotnost morebitnih neraztopljenih delcev,

▼B

— injekcijski volumen (µl) in injekcijska koncentracija (mg/µl),

— ugotovitve, ki kažejo na učinke, ki peljejo k odklonom od idealnega GPC profila,

— podroben opis vseh sprememb v preskusnih postopkih,

— podrobnosti o stopnjah odstopanj,

— vse druge informacije in ugotovitve, ki so pomembne za interpretacijo rezultatov.

3. **LITERATURA**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Priloga

Smernice za korekcijo vsebnosti nizke molekulske mase pri prisotnosti netopnega polimera

Kadar je v vzorcu prisoten netopen polimer, lahko to povzroči izgubo mase v teku GPC analize. Netopen polimer se lahko nepovratno ohrani na koloni ali filtru vzorca, medtem ko raztopni delež vzorca predre skozi kolono. V primeru, kadar je mogoče porast refrakcijskega indeksa (dn/dc) polimera oceniti ali izmeriti, lahko ocenimo maso vzorca, izgubljeno na koloni. V tem primeru, lahko opravimo korekcijo z uporabo zunanjega kalibriranja s standardnimi materiali znane koncentracije in dn/dc, da bi kalibrirali odziv refraktometra. V naslednjem primeru je uporabljen standard poli(metil metakrilat) (pMMA).

Pri zunanjem kalibriranju za analizo akrilnih polimerov, z GPC analiziramo pMMA standard znane koncentracije v tetrahidrofuranu, dobljene podatke pa uporabimo, da poiščemo konstanto na refraktometru, v skladu z enačbo:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kjer je

K = konstanta refraktometra (v mikrovoltsekundah/ml),

R = odziv pMMA standarda (v mikrovoltsekundah),

C = koncentracija pMMA standarda (v mg/ml),

V = injekcijski volumen (v ml) in

dn/dc = porast refrakcijskega indeksa za pMMA v tetrahidrofuranu (v ml/mg)

Naslednji podatki so značilni za pMMA standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = = 9×10^{-5} ml/mg

Dobljeno K vrednost $3{,}05 \times 10^{11}$ nato uporabimo za izračun odziva teoretičnega detektorja, če je 100 % vbrizganega polimera eluirano skozi detektor.

▼B

A.20 OBNAŠANJE RAZTOPINE IZVLEČKA POLIMEROV V VODI

1. METODA

Opisana metoda je v skladu s revidirano različico OECD smernice 120 (1997). Nadaljnje tehnične informacije so navedene v literaturi (1).

1.1 UVOD

Za določene polimere, kot so emulzijski polimeri, bo mogoče potrebno opraviti začetno pripravo, preden se uporabi tukaj podana metoda. Metoda se ne uporablja pri tekočinskih polimerih in polimerih, ki v preskusnih pogojih reagirajo z vodo.

Kadar metoda ni izvedljiva ali mogoča, lahko obnašanje raztopine/izvlečka raziščemo s pomočjo drugih metod. V takšnih primerih je treba uporabljeno metodo natančno obrazložiti in utemeljiti.

1.2 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.3 PRINCIPI PRESKUSNE METODE

Obnašanje raztopine/izvlečka polimerov v vodnem gojišču določimo z uporabo metode z bučko (glej A.6 vodna topnost, metoda z bučko), upoštevajoč spodaj opisane spremembe.

1.4 KRITERIJI KAKOVOSTI

Jih ni.

1.5 OPIS PRESKUSNE METODE

1.5.1 **Oprema**

Za metodo je potrebna naslednja oprema:

— drobilna naprava, npr. mlinček za proizvajanje delcev znane velikosti,

— aparat za tresenje z možnostjo nadzora temperature,

— sistem membranskega filtra,

— ustrezna oprema za analizo,

— standardizirana sita.

1.5.2 **Priprava vzorca**

Reprezentativni vzorec je treba najprej z uporabo ustreznih sit zmanjšati na velikost delca med 0,125 in 0,25 mm. Mogoče bo potrebno hlajenje, da se doseže stabilnost vzorca ali zaradi procesa drobitve. Materiali gumijaste narave se lahko na temperaturi tekočega dušika zdrobijo (1).

Če zahtevane frakcije velikosti delca ni mogoče doseči, je treba velikost delca zmanjšati, kolikor je mogoče, in poročati o rezultatu. V poročilu je treba označiti, kako smo zdrobljen vzorec hranili pred preskusom.

▼B

1.5.3 **Postopek**

Tri vzorce po 10 g preskusne snovi odmerimo v vsako izmed treh posod, zaprtih s steklenimi zamaški, in v vsako posodo dodamo 1 000 ml vode. Če se izkaže, da je ravnanje s količino 10 g polimera neizvedljivo, je treba uporabiti naslednjo najvišjo količino, s katero je mogoče ravnati, in temu ustrezno prilagoditi količino vode.

Posode tesno zamašimo in jih pretresemo pri 20 °C. Uporabiti moramo napravo za tresenje ali mešanje, ki lahko deluje na stalni temperaturi. Po 24 urah vsebino vsake posamezne posode centrifugiramo ali prefiltriramo, koncentracijo polimera v čisti vodni fazi pa določimo z ustrezno analitično metodo. Če ustreznih analitičnih metod za vodno fazo ni na voljo, lahko skupno topljivost/izločljivost ocenimo iz suhe teže prefiltriranega ostanka ali centrifugirane oborine.

Ponavadi je treba po količini razločiti nečistote in aditive na eni strani in vrste z nizko molekulsko maso na drugi. V primeru gravimetrične določitve je prav tako pomembno opraviti prazni preskus brez uporabe vseh preskusnih snovi, da bi izračunali ostanke, do katerih pride med poskusnim postopkom.

Obnašanje raztopine/izvlečka polimerov v vodi pri 37 °C na pH 2 in pH 9 lahko določimo na enak način, kot je opisano za izvajanje eksperimenta pri 20 °C. pH vrednosti se lahko dosežejo z dodajanjem bodisi primernih puferjev ali ustreznih kislin ali baz, kot so hidrokloridna kislina, acetatna kislina, natrij analitične stopnje ali kalijev hidroksid ali NH_3.

Glede na uporabljeno metodo analize moramo izpeljati enega ali dva preskusa. Kadar je za neposredno analizo vodne faze polimerskega delca na voljo dovolj specifičnih metod, bi moral zadostovati en sam preskus, kot je opisano zgoraj. Kadar pa takšne metode niso na voljo in je določitev obnašanja raztopine/izvlečka polimera omejena na posredno analizo z določanjem zgolj skupne vsebnosti organskega karbona (TOC) vodnega izvlečka, je treba opraviti dodaten preskus. Ta dodaten preskus je treba opraviti v treh izvedbah in uporabiti 10-krat manjše vzorce polimera in enake količine vode, kot je bila uporabljena v prvem preskusu.

1.5.4 **Analiza**

1.5.4.1 *Preskus, opravljen z eno velikostjo vzorca*

Metode so lahko na voljo za neposredno analizo sestavin polimera v vodni fazi. Po drugi strani je mogoče upoštevati tudi posredno analizo raztopljenih/izločenih sestavin polimera z določanjem skupne vsebnosti topnih delcev in korekcijo za sestavine, ki niso značilne za polimer.

Analiza vodne faze za vse polimerske vrste je mogoča:

bodisi z dovolj občutljivo metodo, npr.:

— TOC z uporabo persulfata ali digeriranjem dikromata za sprostitev CO_2, ki mu sledi ocena z IR ali kemična analiza,

▼B

— atomska absorpcijska spektrometrija (AAS) ali njen emisijski ekvivalent induktivno sklopljene plazme (ICP) za polimere, ki vsebujejo silikon ali kovino,

— UV absorpcija ali spektrofluorometrija za akrilne polimere,

— LC-MS za vzorce z nizko molekulsko maso,

ali z vakuumskim izhlapevanjem do suhega stanja vodnega ekstrakta in spektroskopijo (IR, UV, itd.) ali AAS/ICP analizo ostanka.

Če analiza vodne faze kot takšne ni izvedljiva, je treba vodni izvleček izvleči z organskim topilom, ki ni združljiv z vodo, npr. s kloriranim hidrokarbonom. Topilo nato izhlapimo, ostanek pa analiziramo kot zgoraj, da bi ugotovili njegovo vsebnost v ustreznem polimeru. Vsako sestavino v tem ostanku, ki je prepoznana kot nečistota ali aditiv, je treba odšteti, da bi določili stopnjo raztopine/izvlečka samega polimera.

Kadar so prisotne relativno velike količine takšnih materialov, je mogoče ostanek potrebno analizirati, na primer, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ali plinsko kromatografijo (GC), da bi razločili nečistote od prisotnega monomera in vrst, ki so iz monomera izpeljane, s čimer nato določimo pravo vsebnost teh vrst.

V nekaterih primerih lahko zadostuje preprosto izhlapevanje organskega topila do suhega stanja in tehtanje suhega ostanka.

1.5.4.2 *Preskus, opravljen z dvema različnima velikostma vzorca*

Vsi vodni izvlečki se analizirajo za TOC.

Gravimetrična določitev se izvede na neraztopljenem/neizvlečenem delu vzorca. Če po centrifugiranju ali filtriranju vsebnosti vsake posode ostanek polimera ostane pritrjen na stene posode, je treba posodo sprati s filtratom, dokler z nje ne odstranimo vseh vidnih ostankov. Temu sledi ponovno centrifugiranje ali filtriranje filtrata. Ostanke, ki ostanejo na filtru ali v centrifugini cevi posušimo pri 40 ^{o}C v vakuumu in jih stehtamo. S sušenjem nadaljujemo, dokler ne dosežemo konstantne teže.

2. **PODATKI**

2.1 PRESKUS, OPRAVLJEN Z ENO VELIKOSTJO VZORCA

Posamezni rezultati za vsako izmed treh bučk in povprečne vrednosti je treba podati in izraziti v enotah mase na volumen raztopine (značilno mg/l) ali mase na maso vzorca polimera (značilno mg/g). Poleg tega je treba podati tudi izgubo teže vzorca (izračunano kot teža vzorca, deljeno s težo začetnega vzorca). Izračunati je treba relativne standardne deviacije (RDS). Za celotno snov (polimer + bistveni aditivi, itd.) in samo za polimere (t.j. po odštetju prispevka takšnih aditivov) je treba podati posamezne številke.

▼B

2.2 PRESKUS, OPRAVLJEN Z DVEMA RAZLIČNIMA VELIKOSTIMA VZORCA

Posamezne TOC vrednosti vodnih izvlečkov dveh trojnih poskusov in povprečno vrednost za vsak poskus je treba podati izraženo v enotah mase na volumen raztopine (značilno mgC/l), kakor tudi v enotah mase na težo začetnega vzorca (značilno mgC/g).

Če med rezultatom na visokem in nizkem razmerju vzorec/voda ni razlike, lahko to pomeni, da so bile vse izločljive sestavine zares izvlečene. V tem primeru ponavadi direktna analiza ni potrebna.

Posamezne teže ostankov je treba podati izražene v odstotku začetnih tež vzorca. Povprečne vrednosti je treba izračunati za vsak poskus. Razlike med 100 % in dobljenimi odstotki predstavljajo odstotke topljivega in izločljivega materiala v izvirnem vzorcu.

3. **POROČANJE**

3.1 PRESKUSNO POROČILO

Preskusno poročilo mora vsebovati naslednje informacije:

3.1.1 **Preskusna snov**

— razpoložljive informacije o preskusni snovi (identiteta, aditivi, nečistote, vsebnost vrst z nizko molekulsko maso).

3.1.2 **Poskusni pogoji**

— opis uporabljenih postopkov in poskusnih pogojev,

— opis analitičnih in detekcijskih metod.

3.1.3 **Rezultati**

— rezultati o topnosti/izločljivosti v mg/l; posamezne in povprečne vrednosti za ekstrakcijske preskuse v različnih raztopinah, porazdeljenih v vsebnosti polimera in nečistotah, aditivih, itd.

— rezultati topnosti/izločljivosti v mg/g polimera,

— TOC vrednosti vodnega ekstrakta, masa vzorca in izračunani odstotki, če so merjeni,

— pH vsakega posameznega vzorca,

— informacije o praznih vrednostih,

— kjer je potrebno, napotki o kemični nestabilnosti preskusne snovi med preskusnim postopkom in analitičnim procesom,

— vse informacije, ki so pomembne za interpretacijo rezultatov.

4. **LITERATURA**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21 **OKSIDATIVNE LASTNOSTI (TEKOČE SNOVI)**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Ta metoda preskušanja je namenjena merjenju potenciala tekoče snovi za povečanje stopnje gorenja ali intenzivnosti gorenja vnetljive snovi ali za tvorbo mešanice z vnetljivo snovjo, ki se sama vname, ko se obe temeljito premešata. Njena podlaga je preskus ZN za oksidativne tekoče snovi (1) in mu je enakovredna. Ker je metoda A.21 v prvi vrsti namenjena izpolnjevanju zahtev Uredbe 1907/2006, je potrebna primerjava le z eno referenčno snovjo. Če je pričakovati, da se bodo rezultati preskusov uporabljali za druge namene ([1]), bo morda potrebno preskušanje in primerjava z dodatnimi referenčnimi snovmi.

Ta preskus je treba opraviti, kadar preverjanje strukturne formule nedvomno pokaže, da snov ne more reagirati eksotermično z vnetljivim materialom.

Pred opravljanjem tega preskusa je koristno imeti predhodne informacije o možnih eksplozivnih lastnostih snovi.

Ta preskus se ne uporablja za trdne snovi, pline, eksplozivne ali zelo lahko vnetljive snovi, ali organske perokside.

Tega preskusa ni treba narediti, kadar so rezultati za preskusno snov iz preskusa ZN za oksidativne tekoče snovi (1) že na voljo.

1.2 DEFINICIJE IN ENOTE

Povprečni čas dvigovanja tlaka je povprečje izmerjenega časa za mešanico v preskusu, da bi se zagotovil dvig tlak s 695 kPa na 2 070 kPa nad zračnim tlakom.

1.3 REFERENČNA SNOV

Potrebna je 65 % (m/m) vodna dušikova kislina (analitske stopnje) kot referenčna snov ([2]).

([1]) Kot na primer v uredbah ZN o prevozu.

([2]) Kislino je treba titrirati pred preskušanjem za potrditev njene koncentracije.

▼B

Če izvajalec preskusa predvideva, da bi se rezultati tega preskusa lahko uporabili za druge namene ([1]), je lahko ustrezno tudi preskušanje z dodatnimi referenčnimi snovmi ([2]).

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Tekoča snov, ki jo je treba preskusiti, se zmeša v razmerju 1 proti 1 glede na maso, z vlaknato celulozo in vlije v tlačno posodo. Če med mešanjem ali polnjenjem pride do samovžiga, nadaljnje preskušanje ni potrebno.

Če samovžig ne nastane, se opravi preskus v celoti. Mešanica se segreje v tlačni posodi, določi se povprečni čas, potreben za dvig tlaka s 690 kPa na 2 070 kPa nad zračnim tlakom. To se primerja s povprečnim časom dviga tlaka za mešanico 1: 1 referenčne snovi/referenčnih snovi in celuloze.

1.5 KRITERIJI KAKOVOSTI

V seriji petih poskusov na eni snovi se rezultati ne smejo razlikovati za več kakor 30 % od aritmetične sredine. Rezultate, ki se razlikujejo za več kakor 30 % od aritmetične sredine, je treba zavreči, izboljšati postopek mešanja in polnjenja in ponoviti preskušanje.

1.6 OPIS METODE

1.6.1 **Priprava**

1.6.1.1 *Vnetljiva snov*

Posušena vlaknata celuloza z dolžino vlaken med 50 in 250 μm in povprečni premerom 25 μm ([3]) se uporablja kot vnetljivi material. Suši se 4 ure do konstantne teže v plasti, ki je debela največ 25 mm, pri 105 °C in se hrani v eksikatorju, s snovjo za sušenje, dokler se ne ohladi in dokler ni potrebna za uporabo. Vsebnost vode v posušeni celulozi mora biti manjša kakor 0,5 % na suho maso ([4]). Če je potrebno, se mora čas sušenja podaljšati, da bi se to doseglo ([5]). Med preskusom je treba ves čas uporabljati isto šaržo celuloze.

([1]) Kot na primer v uredbah ZN o prevozu.
([2]) Npr.: 50 % (m/v) perklorne kisline in 40 % (m/m) natrijevega klorata se uporabi kot referenca 1.
([3]) Npr.: Whatmanov stolpec za kromatografski celulozni prah CF 11, kataložna številka 4021 050.
([4]) Potrjeno (npr.) s Karl-Fisherjevo titracijo.
([5]) Druga možnost je, da se doseže ta vsebnost vode lahko tudi z (npr.) 24-urnim segrevanjem pri 105 °C v brezzračnem prostoru.

▼B

1.6.1.2 *Naprava*

1.6.1.2.1 Tlačna posoda

Potrebna je tlačna posoda. Posoda je sestavljena iz cilindrične jeklene tlačne posode, dolžine 89 mm z zunanjim premerom 60 mm (glej sliko 1). Dve ravni držali se strojno pritrdita na nasprotnih straneh (zmanjšujeta prerez posode na 50 mm), da jo je lažje držati pri namestitvi sprožilnega mehanizma in oddušnega ventila. Posoda, ki ima izvrtino premera 20 mm, ima na obeh straneh do globine 19 mm vrezane navoje, ki ustrezajo 1' „britanske standardne cevi (BSP) ali metrično enakovredni cevi. Zračni ventil v obliki stranske ročice se privije v ukrivljeni sprednji del tlačne posode 35 mm od enega konca in pod kotom 90° glede na strojno obdelani ravnini. Za to je izvrtana 12 mm globoka izvrtina z navoji za privijanje 1/2“ BSP (ali metrično enakovrednega) navoja na koncu stranske ročice. Če je potrebno, pritrdimo za zatesnitev proti uhajanju plina inertno tesnilo. Stranska ročica sega 55 mm za ohišje tlačne posode in ima izvrtino 6 mm. Konec stranske ročice ima izrezane navoje za pritrditev naprave za spreminjanje pritiska z opno. Uporabimo lahko katero koli napravo za merjenje tlaka, pod pogojem, da nanjo ne vplivajo vroči plini ali razpadli produkti in da se lahko odziva na stopnje dviga tlaka 690–2 070 kPa v manj kakor 5 ms.

Konec tlačne posode, ki je najbolj oddaljen od stranske ročice, se zapre s sprožilnim mehanizmom, ki je opremljen z dvema elektrodama, od katerih je ena izolirana od ohišja mehanizma, druga pa ne. Drugi konec tlačne posode je zaprt z okroglo razpočno ploščo (tlak preboja približno 2 200 kPa), ki jo drži na mestu vijak z 20 mm izvrtino. Če je potrebno, pritrdimo za zatesnitev proti uhajanju plina inertno tesnilo. Podporno podnožje (slika 2) drži sklop v pravilnem položaju med uporabo. Ponavadi se sestoji iz osnovne plošče iz mehkega jekla velikosti 235 mm × 184 mm × 6 mm, na katero je pritrjen po dolžini 185 mm profil dimenzij kvadrata 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Iz kvadratnega profila se izrežeta po dolžini dve nasprotni stranici, tako da nastane nad njima 86 mm dolg podest, ki ima dve nogi z ravnima stranicama. Konca teh ravnih stranic sta odrezana pod kotom 60 ° na horizontalno ravnino in privarjena na osnovno ploščo. Utor, ki je 22 mm širok in 46 mm globok, je strojno vrezan v eno stran gornjega konca podlage, da se vanj uleže stranska ročica, kadar potisnemo sklop s tlačno posodo navzdol, najprej konec s sprožilnim mehanizmom, v podpornik podesta. Na spodnjo zunanjo prednjo stran kvadratnega profila je privarjen kos jekla, širine 30 mm in debeline 6 mm, ki deluje kakor distančnik. Dva 7 mm palčna vijaka, privita na nasprotni strani, pomagata držati tlačno posodo trdno na mestu. 12 mm široki trakovi iz 6 mm debelega jekla, privarjeni na stranske dele, ob robu podlage kvadratnega profila, podpirata tlačno posodo s spodnje strani.

▼B

1.6.1.2.2 Sistem vžiga

Sistem vžiga je sestavljen iz 25 cm dolge žice iz niklja in kroma s premerom 0,6 mm in uporom 3,85 ohm/m. Žica se zvije s palico premera 5 mm v obliko tuljave in se pritrdi na elektrodo sprožilnega mehanizma. Tuljava mora imeti eno od oblik, prikazanih na sliki 3. Razdalja med dnom posode in spodnjim delom tuljave vžiga mora znašati 20 mm. Če elektrodi nista nastavljivi, je treba izolirati konca žice za vžig med tuljavo in dnom posode s keramičnim obročem. Žico segreva neprekinjeno tokovno napajanje, ki lahko zagotovi moč najmanj 10 amperov.

1.6.2 **Potek preskušanja** ([1])

Naprava, ki se sestoji iz zračnega ventila in sistema segrevanja, vendar brez nameščene okrogle razpočne plošče, je podprta s koncem s koncem, kjer je sprožilni mehanizem, obrnjenim navzdol. 2,5 g tekočine, ki jo je treba preskusiti, se zmeša z 2,5 g posušene celuloze v stekleni čaši in uporabimo stekleno paličico za mešanje ([2]). Zaradi varnosti je treba mešanje opraviti z varnostnim ščitom med izvajalcem preskusa in mešanico. Če se mešanica vname med mešanjem ali polnjenjem, nadaljnje preskušanje ni potrebno. Mešanica se dodaja v majhnih odmerkih po kapljicah v tlačno posodo, prepričati se je treba, da se mešanica nabira okoli tuljave vžiga in je z njo v dobrem stiku. Pomembno je, da se tuljava ne deformira med postopkom pakiranja, ker lahko to povzroči zmotne rezultate ([3]). Namesti se razpočna plošča in tesno privije vijak, ki jo drži na njenem mestu. Napolnjeno posodo prenesemo na sprožilno podporno podnožje, z okroglo razpočno ploščo obrnjeno navzgor, nameščena mora biti v ustrezni oklepni dimni omarici ali sprožilni celici. Tokovno napajanje se priključi na zunanje priključne letve sprožilnega mehanizma in uporabi moč 10 A. Čas med začetkom mešanje in vključitvijo močnostnega napajanja ne sme presegati 10 minut.

Signal, ki ga oddaja zračni ventil za tlak, se zabeleži z ustreznim sistemom, ki omogoča hkrati vrednotenje in oblikovanje stalnega zapisa dobljenega časovnega tlačnega profila (npr. začasen zapisovalnik skupaj z zapisovalnikom grafa). Mešanica se segreva, dokler se okrogla razpočna plošča ne razpoči ali dokler ne mine vsaj 60 s. Če razpočna plošča poči, je treba pustiti mešanico, da se ohladi, preden se naprava skrbno razstavi in pri tem upoštevati varnostne ukrepe zaradi podtlaka, ki lahko nastane. Izvede se 5 poskusov s preskusno snovjo in z referenčno snovjo/snovmi. Čas, potreben za dvig tlaka s 690 kPa na 2 070 kPa nad zračni tlak, se zabeleži. Izračuna se povprečni čas dviga tlaka.

V nekaterih primerih lahko snovi sprožijo dvig tlaka (previsok ali prenizek tlak) zaradi kemijskih reakcij, ki niso značilne za oksidativne lastnosti snovi. V takšnih primerih bo morda potrebno preskus ponoviti z inertno snovjo, npr. z diatomejsko zemljo (kieselguhr) namesto celuloze za pojasnitev vrste reakcije.

([1]) Mešanice oksidantov s celulozo je treba obravnavati kot potencialno eksplozivne in z njimi ustrezno pravilno ravnati.

([2]) V praksi se to lahko to doseže tako, da se pripravi mešanica 1: 1 tekoče snovi, ki jo je treba preskusiti, in celuloze v večji količini, kot je potrebno za poskus, in prenesti 5 ± 0,1 g v tlačno posodo. Mešanico je treba za vsak poskus sveže pripraviti.

([3]) Zlasti se je treba izogibati stiku med sosednjimi zavoji tuljave.

▼B

2. **PODATKI**

Časi dviga tlaka za preskusno snov in referenčno snov/snovi. Časi dviga tlaka za preskuse z inertno snovjo, če se opravljajo.

2.1 OBRAVNAVANJE REZULTATOV

Izračunajo se povprečni časi dviga tlaka za preskusno snov in referenčno snov/snovi.

Izračuna se povprečni čas dviga tlaka za preskuse z inertno snovjo (če se opravljajo).

Nekateri primeri rezultatov so prikazani v Tabeli 1.

Tabela 1

Primer rezultatov [a]

Snov [b]	Povprečni čas dviga tlaka za mešanico s celulozo 1:1 (ms)
Amonijev dikromat, nasičena vodna raztopina	20 800
Kalcijev nitrat, nasičena vodna raztopina	6 700
Železov nitrat, nasičena vodna raztopina	4 133
Litijev perklorat, nasičena vodna raztopina	1 686
Magnezijev perklorat, nasičena vodna raztopina	777
Nikljev nitrat, nasičena vodna raztopina	6 250
Dušikova kislina, 65 %	4 767 [c]
Perklorova kislina, 50 %	121 [c]
Perklorova kislina, 55 %	59
Kalijev nitrat, 30 % vodna raztopina	26 690
Srebrov nitrat, nasičena vodna raztopina	[d]
Natrijev klorat, 40 % vodna raztopina	2 555 [c]
Natrijev nitrat, 45 % vodna raztopina	4 133
Inertna snov	
Vodna celuloza	[d]

[a] Glej sklic (1) za razvrstitev v shemo prevoza ZN.
[b] Nasičeno raztopino je treba pripraviti pri 20 °C.
[c] Srednja vrednost pri poskusih iz primerjave med laboratoriji.
[d] Maksimalni tlak 2 070 kPa ni dosežen.

▼B

3. **POROČILO**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

— vrsto, sestavo, čistost, itd. preskušane snovi,

— koncentracijo preskusne snovi,

— postopek sušenja uporabljene celuloze,

— vsebnost vode uporabljene celuloze,

— rezultate meritev,

— rezultate preskusov z inertno snovjo, če so bili izvedeni,

— izračunane povprečne čase dviga tlaka,

— vsa odstopanja od te metode in razloge zanje,

— vse dodatne informacije ali pripombe, ki so pomembne za razlago rezultatov.

3.2 RAZLAGA REZULTATOV ([1])

Rezultati preskusa se ocenijo na podlagi tega;

(a) ali se mešanica preskušane snovi in celuloze spontano vname in

(b) primerjave povprečnega časa, ki je potreben, da tlak naraste s 690 kPa na 2 070 kPa s povprečnim časom za referenčno snov/snovi.

Tekočo snov je treba obravnavati, kot da je oksidant, kadar:

(a) se mešanica 1:1, glede na maso, snovi in celuloze spontano vname, ali

(b) ima mešanica 1:1, glede na maso, snovi in celuloze, manjši ali enak povprečni čas dviga tlaka, kot je povprečni čas dviga tlaka mešanice 1:1, glede na maso, 65 % (m/m) vodne dušikove kisline in celuloze.

Da bi se izognili napačnim pozitivnim rezultatom, je treba po potrebi pri razlagi rezultatov upoštevati tudi rezultate, dobljene pri preskušanju snovi z inertnim materialom.

([1]) Glej sklic 1 za razlago rezultatov v skladu z zakonodajo ZN o prevozu z uporabo različnih referenčnih snovi.

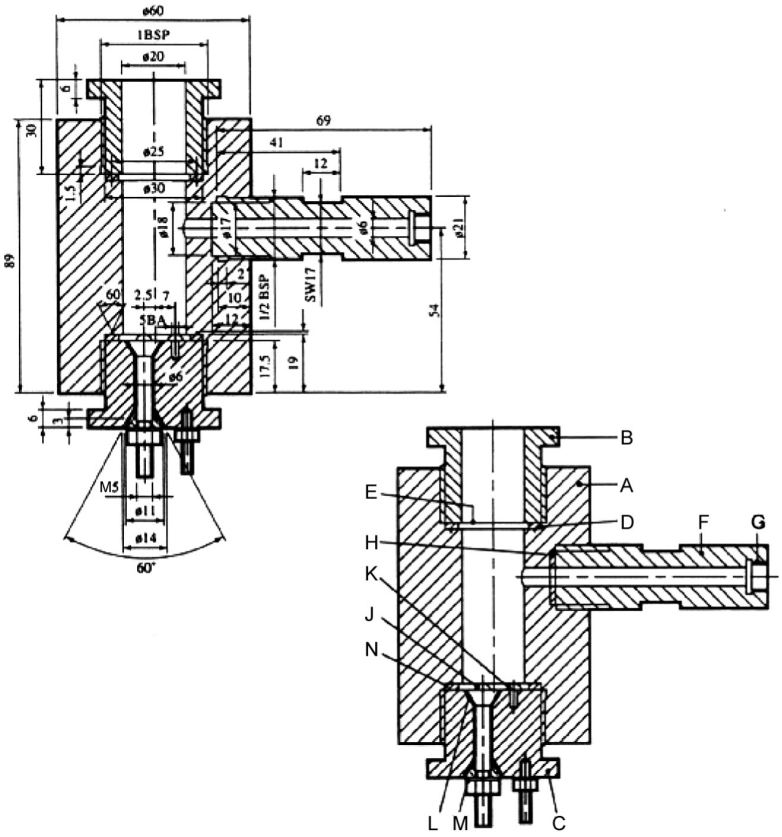
▼B

4. **VIRI**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Slika 1

Tlačna posoda



(A) Ohišje tlačne posode

(B) Vijak za utrditev okrogle razpočne plošče

(C) Sprožilni mehanizem

(D) Tesnilo iz mehkega svinca

(E) Okrogla razpočna plošča

(F) Stranska ročica

(G) Glava zračnega ventila

(H) Podložka

(J) Izolirana elektroda

(K) Neizolirana elektroda

(L) Izolacija

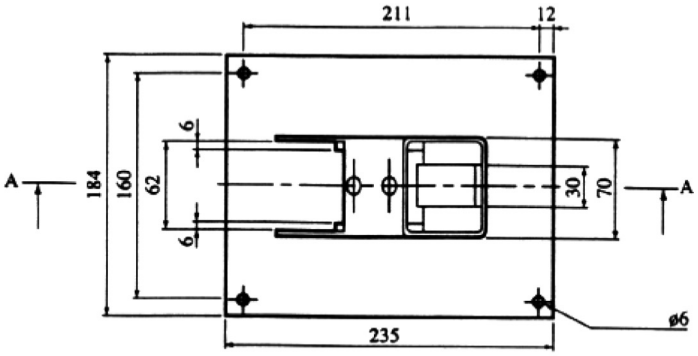
(M) Jekleni stožec

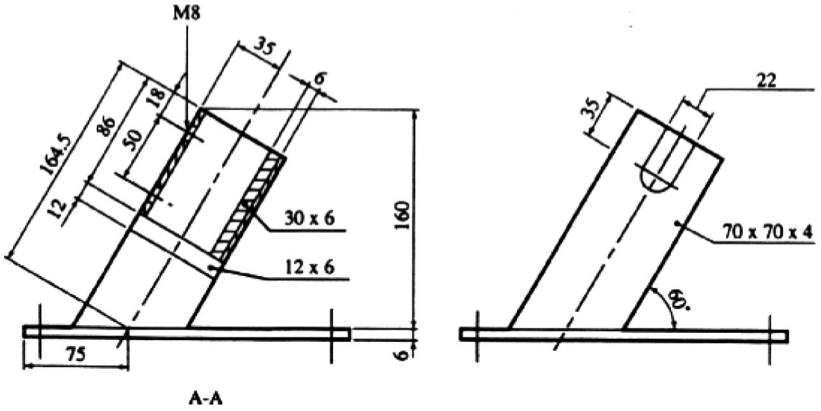
(N) Utor za prilagajanje podložke

▼B

Slika 2

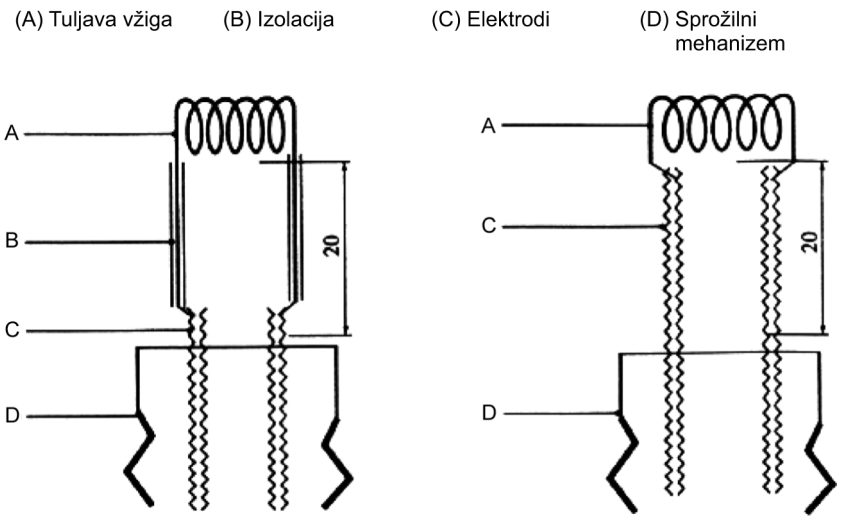
Podporni podest





Slika 3

Sistem vžiga



Opomba: Uporabi se lahko kateri koli od obeh načrtov.

▼M1

A.22. GEOMETRIJSKI SREDNJI PREMER GLEDE NA DOLŽINO VLAKEN

1. METODA

1.1 UVOD

Ta metoda opisuje postopek za merjenje geometrijskega srednjega premera glede na dolžino vlaken (LWGMD – Length Weighted Geometric Mean Diameter) velikih ročno izdelanih mineralnih vlaken (MMMF – Man Made Mineral Fibres). Ker ima LWGMD populacije 95 % verjetnosti, da leži med 95 odstotnimi stopnjami zaupanja (LWGMD ± dve standardni napaki) vzorca, bo dejanska vrednost (preskusna vrednost) nižja od 95 % meje zaupanja vzorca (tj. LWGMD ± dve standardni napaki). Metoda temelji na dopolnitvi (junij 1994) osnutka industrijskega postopka HSE, ki je bil usklajen na sestanku med ECFIA in HSE v Chestru dne 26.9.1993 in razvit za in iz drugega medlaboratorijskega poskusa (1, 2). To merilno metodo se lahko uporablja za označevanje premera vlaken velikih snovi ali proizvodov, ki vsebujejo MMMF, vključno z ognjeodpornimi keramičnimi vlakni (RFC), ročno izdelanimi steklenimi vlakni (MMVF), kristalnimi in polikristalnimi vlakni.

Določanje utežnostnega faktorja dolžine je sredstvo za izravnavo učinkov na porazdelitev premera, povzročenega zaradi preloma dolgih vlaken pri vzorčenju ali ravnanju z materialom. Geometrična statistika (geometrično povprečje) se uporablja za merjenje velikosti porazdelitve premera MMMF, ker imajo ti premeri običajno velikost porazdelitve, ki se približuje normalnemu logaritmu.

Merjenje dolžine kot tudi premera je obsežno in zahteva veliko časa, vendar, če se meritve izvedejo samo na tistih vlaknih, ki se dotikajo neskončno tanke črte v vidnem polju SEM, potem je verjetnost izbire danega vlakna sorazmerna njegovi dolžini. Ker to določa dolžino pri izračunih utežnostnega faktorja dolžine, je edina zahtevana meritev, meritev premera, tako da je možno LWGMD-2SE izračunati, kot je to opisano.

1.2 DEFINICIJE

Delec: Predmet z razmerjem dolžina/širina, ki je manjše od 3:1.

Vlakno: Predmet z razmerjem dolžina/širina, ki je manjše od 3:1.

1.3 OBSEG IN OMEJITVE

Ta metoda je zasnovana tako, da je možno pogledati porazdelitev premerov, ki imajo mediano premera od 0,5 μm do 6 μm. Večje premere je možno izmeriti, če se uporabijo manjše povečave SEM, vendar je metoda izredno omejena na natančno porazdelitev vlaken, tako da se priporoča uporaba meritev s TEM (prenosni elektronski mikroskop), če je mediana premera pod 0,5 μm.

▼M1

1.4 NAČELA METODE PRESKUŠANJA

Število reprezentančnih vzorcev jeder se vzame iz krpe vlaken ali iz prostih velikih vlaken. Velika vlakna se z uporabo postopka drobljenja skrajšajo po dolžini, reprezentativni podvzorci pa se razpršijo v vodi. Alikvoti se izvlečejo in filtrirajo skozi 0,2 μm velike pore polikarbonskega filtra in se pripravijo za preskušanje s tehniko skeniranja z elektronskim mikroskopom (SEM). Premeri vlaken se merijo pri povečavi zaslona × 10 000 ali večji ([1]), pri tem pa se uporabi metoda sekanja črte, da je tako dosežena nevtralna ocena mediane premera. Izračuna se spodnjih 95 % intervala zaupanja (na osnovi enostranskega preskusa), tako da je možno dati oceno najnižje vrednosti srednjega geometrijskega premera glede na dolžino vlakna materiala.

1.5 OPIS METODE PRESKUŠANJA

1.5.1 **Varnostni/previdnost**

Do največje možne mere je treba zmanjšati izpostavljenost osebja pred vlakni, ki se uporabljajo v letalstvu, zato je za ravnanje s suhimi vlakni treba uporabljati dimno komoro ali komoro, v katero posegamo z rokavicami. Potrebno je spremljanje občasne izpostavljenosti osebja, da bi se določila učinkovitost kontrolne metode. Pri rokovanju z MMMF je treba nositi rokavice za enkratno uporabo, da se tako zmanjša draženje kože in prepreči navzkrižno onesnaženje.

1.5.2 **Aparature/naprave**

— Stiskalnica in barve (za tlak do 10 MPa),

— filtri s kapilarnimi karbonatnimi porami velikosti 0,2 μm (premera 25 mm),

— membranski filtri s 5 μm velikimi celuloznimi porami za uporabo pri podpornih filtrih,

— aparature za filtriranje stekla (ali sistem za filtriranje odpadkov), ki sprejmejo filtre s premorom 25 mm (npr. Millipore komplet za mikroanalizo stekla, tip št. XX10 025 00),

— sveže destilirana voda, ki je bila filtrirana skozi filter z velikostjo por 0,2 μm za odstranjevanje mikroorganizmov,

— naprava za pršenje nanosov na zlato ali zlate/paladijeve površine,

— skenirni elektronski mikroskop z ločitvijo do 10 nm in s povečavo ×100 000,

— razno: lopatice, rezilo skalpela tipa 24, pincete, cevi SEM, karbonsko lepilo ali karbonski lepilni trak, koloidno srebro,

— ultrazvočno tipalo ali namizna ultrazvočna kopel,

— naprava za jemanje vzorcev jedra ali vrtalnik za pluto za odvzem vzorcev iz MMMF krpe.

([1]) Ta vrednost povečave je določena za vlakna s premerom 3 μm, za vlakna s premerom 6 μm pa je primernejša povečava ×5 000.

▼M1

1.5.3 **Postopek preskusa**

1.5.3.1 *Vzorčenje*

Za odvzem vzorcev krp in plošč se uporablja 25 mm naprava za jemanje vzorcev jeder ali vrtalnik za pluto. Vzorce se odvzame enakomerno po vsej dolžini krajše strani krpe ali iz poljubne površine, če so na razpolago daljše strani krpe. Za odvzem naključnih vzorcev prostih vlaken se uporablja ista oprema. Če je le možno, naj se odvzame šest vzorcev, ki odražajo prostorske razlike velikega materiala.

Šest vzorcev jeder je treba z 10 MPa zdrobiti v 50 mm kalupu. Material se meša z lopatico in ponovno stisne z 10 MPa. Nato se material odstrani iz kalupa in shrani v zapečateno steklenico.

1.5.3.2 *Priprava vzorca*

Po potrebi se organska veziva lahko odstranijo tako, da se vlakna za ca. 1 uro vstavijo v peč pri 450 °C.

Napravite stožčasto obliko in jo razdelite na štiri dele (to je treba narediti v prašni komori).

Z lopatico dodajte majhno količino (< 0,5 g) vzorca v 100 ml sveže destilirane vode, ki ste jo predhodno filtrirali skozi membranski filter 0,2 μm (alternativno se lahko uporabijo izviri izjemno čiste vode, če se pokažejo kot zadovoljivi). Temeljito razpršite s pomočjo ultrazvočnega tipala, ki deluje z močjo 100 W in je uglašeno tako, da povzroča kavitacije. (Če tipalo ni na razpolago, uporabite naslednjo metodo: večkrat pretresite in obrnite za 30 s; za nekaj minut izpostavite ultrazvoku v namizni ultrazvočni napravi; nato ponovno pretresite in obrnite za nadaljnjih 30 s).

S široko pipeto (zmogljivosti 2–5 ml) takoj po razpršitvi vlakna odstranite večje število alikvotov (npr. tri alikvote po 3, 6 in 10 ml).

Vaakumsko filtrirajte vsak alikvot skozi polikarbonski filter 0,2 μm, ki mu pomaga podporni filter MEC s 5 μm porami, in uporablja 25 mm stekleni filtrski lijak z valjastim rezervoarjem. Približno 5 ml filtrirane destilirane vode je treba vliti v lijak in počasi s pipeto nakapati alikvot v vodo, pri tem pa držati vrh pipete pod meniskusom. Pipeto in rezervoar je po kapljanju treba temeljito splahniti, ker tanka vlakna težijo k površini.

Skrbno odstranite filter in ga ločite od podpornega filtra, preden ga vstavite v drugo posodo na sušenje.

▼M1

S skalpelom tipa 24 odrežite četrtino ali polovico dela filtra z filtrskimi ostanki in pri tem uporabite sunkovite gibe. Previdno pritrdite odrezani del na trn SEM in pri tem uporabite vložke lepljivega ogljika ali ogljikovo lepilo. Koloidno srebro se nanese na najmanj tri mesta, da se izboljša električni stik na robovih filtra in trna. Ko se lepilo/koloidno srebro posuši, nabrizgajte sloj približno 50 nm zlata ali zlata/paladija na površino ostankov.

1.5.3.3 *Umerjanje in delovanje SEM*

1.5.3.3.1 U m e r j a n j e

Umerjanje SEM je treba preveriti vsaj enkrat tedensko (idealno enkrat na dan) in pri tem uporabiti mrežo za umerjanje. Umerjanje je treba preveriti glede na potrjene standarde in če izmerjena vrednost (SEM) ni v območju ±2 % od potrjene vrednosti, potem je treba umerjanje SEM prilagoditi in ponovno preveriti.

SEM mora biti sposoben ločiti vsaj najmanjši viden premer 0,2 μm pri uporabi prave matrike vzorčenja in pri povečavi × 2 000.

1.5.3.3.2 D e l o v a n j e

SEM naj obratuje pri povečavi 10 000 ([1]) pod pogoji, ki omogočajo dobro ločljivost s sprejemljivimi slikami pri počasnem skeniranju, npr. 5 s za sliko. Čeprav so delovne zahteve za različne SME lahko različne, je za doseganje najboljše vidljivosti in ločljivosti na splošno treba uporabiti nastavitev za majhno površino fokusa in kratko delovno razdaljo, z relativno nizko atomsko težo materialov in pospeševalnimi napetostmi 5–10 keV. Ker se izvaja linearni prehod, se priporoča uporaba naklona 0^{o} za najmanjše potrebno ponovno fokusiranje ali, če je SEM v evcentričnem stanju, evcentrična delovna razdalja. Če material ne vsebuje vlaken majhnega premera in so premeri vlaken veliki (> 5 μm), se lahko uporabi manjša povečava.

1.5.3.4 *Določanje velikosti*

1.5.3.4.1 P r e g l e d z n i z k o p o v e č a v o z a o c e n o v z o r c a

Najprej naj se vzorec pregleda z nizko povečavo, da se ugotovi prisotnost kopičenja velikih vlaken in da se oceni gostota vlaken. V primeru prevelikega kopičenja se priporoča priprava novega vzorca.

Za statistično točnost je potrebno izmeriti najmanjše število vlaken, visoka gostota vlaken, ki je na videz primerna za pregled praznih polj, pa zahteva veliko časa in ne prispeva k analizi. Če je filter preobremenjen, je težko meriti vsa merljiva vlakna in ker velika vlakna lahko zakrivajo mala, ki potem niso vidna.

([1]) Za vlakna s premerom 3 μm glej prejšnjo opombo.

▼**M1**

Nagnjenost k precenjevanju LWGMD je lahko rezultat gostote vlaken nad 150 vlaken/mm pri linearnem prehodu. Na drugi strani pa nizke koncentracije vlaken povečujejo čas analize in je pogosto stroškovno ugodno pripraviti vzorec gostote vlakna blizu najugodnejšega, kot vztrajati z oceno pri filtrih z nizko koncentracijo. Najugodnejša gostota vlaken naj bi dala povprečje o enem ali dveh ocenjevanih vlaknih v vidnih poljih pri povečavi 5 000. Najugodnejša gostota je odvisna od velikost (premera) vlaken, zato mora operater uporabiti nekatere strokovne presoje, da lahko odloči ali je gostota vlaken blizu najugodnejše ali ne.

1.5.3.4.2 Določanje utežnostnega faktorja dolžine za premere vlaken

Štejejo se samo vlakna, ki se dotaknejo (ali prečkajo) (neskončno) tanko črto na zaslonu SEM. Zato je na zaslonu narisana vodoravna (ali navpična) črta, ki poteka skozi sredino zaslona.

Alternativno je na sredini zaslona postavljena ena sama točka, v eni smeri pa poteka stalno skeniranje filtra. Premer se izmeri in zapiše za vsako vlakno z razmerjem dolžina/širina večjim od 3:1, ki se dotika ali prečka to točko.

1.5.3.4.3 Določanje velikosti vlakna

Priporoča se merjenje najmanj 300 vlaken. Vsako vlakno se meri le enkrat v sečišču s črto ali točko, narisano na sliki (ali blizu sečišča, če je rob vlakna nejasen). Pri vlaknih z neenakomernim presekom se uporabi meritev, ki predstavlja povprečje premera vlakna. Paziti je treba pri določanju robov in merjenju najkrajše razdalje med robovi vlakna. Določanje velikosti je možno on-line ali off-line na shranjenih slikah ali fotografijah. Priporoča se uporaba polavtomatskih sistemov za merjenje na slikah, ki nalagajo podatke neposredno v razpredelnice, ker se tako prihrani čas, zmanjša število napak pri prepisovanju, izračuni pa so lahko avtomatizirani.

Konci dolgih vlaken naj se preverijo pri majhnih povečavah, da se zagotovi, da se ne zvijajo nazaj v merilno ali vidno polje in so vlakna izmerjena le enkrat.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Premeri vlaken po navadi nimajo normalne porazdelitve. Če pa se izvede logaritmična transformacija, je možno dobiti porazdelitev, ki se približuje normalni.

Izračunajte aritmetično srednjo vrednost (srednji lnD) in standardno deviacijo (SD_{lnD}) logaritma z osnovo e (lnD) za n premerov vlakna (D).

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{\text{n}} \quad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardna deviacija se deli s kvadratnim korenom števila meritev (n), da dobimo standardno napako (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Dvakrat odštejte standardno napako od srednje vrednosti in izračunajte njen eksponent (srednja vrednost minus dve standardni napaki) in tako dobite geometrijsko srednjo vrednost minus dve geometrijski standardni napaki.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU)

Poročilo o preskusu naj vsebuje vsaj naslednje informacije:

— vrednost LWGMD-2SE,

— kakršna koli odstopanja, še zlasti tista, ki vplivajo na natančnost in točnost rezultatov z ustreznimi obrazložitvami.

4. **VIRI**

(1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

(2) G. Burdett in G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 PORAZDELITVENI KOEFICIENT (1-OKTANOL/VODA): METODA POČASNEGA MEŠANJA

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 123 (2006). Vrednosti porazdelitvenega koeficienta 1-oktanol/voda (P_{OW}) do log P_{OW} 8,2 so bile natančno določene z metodo počasnega mešanja (1). Zato gre za primeren preskusni pristop k neposrednemu določanju P_{OW} zelo hidrofobnih snovi.

2. Preostali metodi za določanje porazdelitvenega koeficienta 1-oktanol/vode (P_{OW}) sta metoda „stresanja bučke“ (2) in določanje P_{OW} na podlagi retencijskega vedenja pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo (3). Pri metodi „stresanja bučke“ so pogosti artefakti zaradi prenosa mikrokapljic oktanola v vodno fazo. S povečevanjem vrednosti P_{OW} prisotnost teh kapljic v vodni fazi vodi do povečanega precenjevanja koncentracije preskusne snovi v vodi. Zato je uporaba te metode omejena na snovi z log P_{OW} < 4. Pri drugi metodi se z opiranjem na zanesljive podatke iz neposredno določenih vrednosti P_{OW} umeri razmerje med retencijskim vedenjem pri HPLC in izmerjenimi vrednostmi P_{OW}. Na voljo je bil tudi osnutek smernice OECD za določanje porazdelitvenih koeficientov 1-oktanol/voda za snovi, ki lahko ionizirajo (4), ki pa se ne uporablja več.

3. Ta preskusna metoda je bila razvita na Nizozemskem. Natančnost metod, opisanih v tem dokumentu, je bila validirana in optimizirana v primerjalni validacijski študiji, v kateri je sodelovalo 15 laboratorijev (5).

ZAČETNI PREUDARKI

Pomen in uporaba

4. Za inertne organske snovi so bila ugotovljena zelo pomembna razmerja med porazdelitvenimi koeficienti 1-oktanol/voda (P_{OW}) in njihovo bioakumulacijo v ribah. Poleg tega je bilo dokazano, da je P_{OW} povezan s strupenostjo za ribe, pa tudi s sorpcijo kemikalij na trdne snovi, kot so prsti in usedline. Obsežen pregled razmerij je naveden v viru (6).

5. Ugotovljena so bila najrazličnejša razmerja med porazdelitvenim koeficientom 1-oktanol/voda in drugimi lastnostmi snovi, pomembnimi za okoljsko toksikologijo in kemijo. Porazdelitveni koeficient 1-oktanol/voda je zato postal ključni parameter pri ocenjevanju tveganja kemikalij za okolje, pa tudi pri napovedovanju vpliva kemikalij v okolju.

Področje uporabe

6. S preskusom s počasnim mešanjem naj bi se zmanjševala tvorba mikrokapljic iz kapljic 1-oktanola v vodni fazi. Posledično ne pride do precenjevanja vodne koncentracije zaradi molekul preskusne snovi, ki so združene s takimi kapljicami. Zato je metoda počasnega mešanja posebej primerna za ugotavljanje P_{OW} za snovi s pričakovanimi vrednostmi log P_{OW} 5 in več, za katere metoda stresanja bučke pogosto da napačne rezultate (2).

▼M4

OPREDELITEV POJMOV IN ENOTE

7. Porazdelitveni koeficient snovi med vodo in lipofilnim topilom (1-oktanolom) označuje ravnotežno porazdelitev kemikalije med obema fazama. Porazdelitveni koeficient med vodo in 1-oktanolom (P_{OW}) je opredeljen kot razmerje ravnotežnih koncentracij preskusne snovi v 1-oktanolu, nasičenem z vodo (C_O), in vodi, nasičeni z 1-oktanolom (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Kot razmerje koncentracij je porazdelitveni koeficient brez razsežnosti. Najpogosteje je podan kot desetiški logaritem (log P_{OW}). Odvisen je od temperature, sporočeni podatki pa morajo vključevati temperaturo merjenja.

NAČELO METODE

8. Za določitev porazdelitvenega koeficienta se voda, 1-oktanol in preskusna snov medsebojno uravnotežijo pri konstantni temperaturi. Potem se določijo koncentracije preskusne snovi v obeh fazah.

9. Težave pri preskušanju, povezane s tvorbo mikrokapljic med preskusom stresanja bučke, se lahko zmanjšajo z uporabo preskusa s počasnim mešanjem, ki je predlagan v tem dokumentu. V njem se voda, 1-oktanol in preskusna snov uravnotežijo v termostatiranem mešalnem reaktorju. Izmenjava med fazama se pospeši z mešanjem. To povzroči omejeno turbulenco, kar pospeši izmenjavo med 1-oktanolom in vodo, ne da bi se pri tem tvorile mikrokapljice (1).

UPORABNOST PRESKUSA

10. Ker lahko prisotnost snovi, ki niso preskusna snov, vpliva na koeficient aktivnosti preskusne snovi, je treba preskusno snov preskušati v čistem stanju. Za preskus porazdelitve 1-oktanol/voda je treba uporabiti najvišjo tržno dostopno čistost.

11. Ta metoda se uporablja za čiste snovi, ki ne disociirajo ali asociirajo in ne kažejo bistvene medfazne aktivnosti. Uporablja se lahko za ugotavljanje porazdelitvenega razmerja 1-oktanol/voda takih snovi in zmesi. Kadar se metoda uporablja za zmesi, so ugotovljena porazdelitvena razmerja 1-oktanol/voda pogojna ter odvisna od kemijske sestave preskušane zmesi in elektrolitske sestave, uporabljene za vodno fazo. Če se izvedejo dodatni koraki, je metoda uporabna tudi za spojine, ki disociirajo ali asociirajo (odstavek 12).

12. Ker porazdelitev 1-oktanol/voda pri snoveh, ki disociirajo – kot so organske kisline in fenoli, organske baze ter organokovinske snovi –, vključuje več ravnotežij v vodi in 1-oktanolu, je porazdelitveno razmerje 1-oktanol/voda pogojna konstanta, ki je močno odvisna od elektrolitske sestave (7) (8). Zato je treba pri določanju porazdelitvenega razmerja 1-oktanol/voda pri preskusu nadzirati vrednost pH in elektrolitsko sestavo ter o njiju poročati. Pri ocenjevanju teh porazdelitvenih razmerij je potrebna strokovna presoja. Z uporabo vrednosti disociacijskih konstant je treba izbrati ustrezne vrednosti pH, tako da se porazdelitveno razmerje določi za vsako ionizacijsko stanje. Kadar se preskušajo organokovinske spojine, je treba uporabiti nekompleksirajoče pufre (8). Ob upoštevanju sedanjega znanja o vodni kemiji (kompleksacijske konstante, disociacijske konstante) je treba preskusne pogoje izbrati tako, da se lahko oceni speciacija preskusne snovi v vodni fazi. Ionska moč mora biti v vseh preskusih enaka, kar se doseže z uporabo osnovnega elektrolita.

▼M4

13. Kadar se preskus opravlja za snovi z nizko topnostjo v vodi ali visokim P_{OW}, se lahko pojavijo težave, saj koncentracije v vodi postanejo zelo nizke, kar oteži njihovo natančno določanje. Ta preskusna metoda vsebuje napotke, kako to težavo odpraviti.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

14. Kemijski reagenti morajo biti analitsko čisti ali še kakovostnejši. Priporoča se uporaba neoznačenih preskusnih snovi z znano kemijsko sestavo in po možnosti vsaj 99-odstotno čistostjo ali izotopsko označenih preskusnih spojin z znano kemijsko sestavo in radiokemijsko čistostjo. Pri sledilih s kratko razpolovno dobo je treba uporabiti popravke razpada. Pri izotopsko označenih preskusnih spojinah je treba uporabiti analitsko metodo, specifično za dano kemikalijo, da se zagotovi, da se izmerjena radioaktivnost nanaša neposredno na preskusno snov.

15. Oceno log P_{OW} je mogoče dobiti s tržno dostopno programsko opremo za ocenjevanje log P_{OW} ali z uporabo razmerja topnosti v obeh topilih.

16. Pred izvedbo preskusa s počasnim mešanjem za določitev P_{OW} morajo biti na voljo naslednje informacije o preskusni snovi:

(a) strukturna formula;

(b) ustrezne analitske metode za ugotavljanje koncentracije snovi v vodi in 1-oktanolu;

(c) disociacijske konstante snovi, ki lahko ionizirajo (Smernica OECD 112 (9));

(d) topnost v vodi (10);

(e) abiotska hidroliza (11);

(f) dobra biorazgradljivost (12);

(g) parni tlak (13).

OPIS METODE

Oprema in aparatura

17. Potrebna je standardna laboratorijska oprema, zlasti:

— za mešanje vodne faze se uporabljajo magnetna mešala in magnetne mešalne palice, prevlečene s teflonom,

— analitski instrumenti, primerni za ugotavljanje koncentracije preskusne snovi pri pričakovanih koncentracijah,

— mešalna posoda s pipo pri dnu. Glede na oceno log P_{OW} in mejo zaznavnosti (LOD) preskusne spojine je treba razmisliti o uporabi reakcijske posode, ki ima enako geometrijo in je večja od enega litra, da se lahko zagotovi zadosten volumen vode za kemijsko ekstrakcijo in analizo. To privede do višjih koncentracij v vodnem ekstraktu in s tem do zanesljivejšega analitskega določanja. Dodatek 1 vsebuje preglednico, v kateri so navedene ocene najmanjšega potrebnega volumna, LOD spojine, njen ocenjeni log P_{OW} in njena topnost v vodi. Preglednica temelji na razmerju med log P_{OW} ter razmerjem topnosti v oktanolu in vodi, kot so ga predstavili Pinsuwan idr. (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

kjer je

$SR = S_{okt}/S_w$ (v molih),

ter na razmerju, ki ga je podal Lyman (15) za napovedovanje topnosti v vodi. Topnosti v vodi, izračunane z enačbo, kot je navedena v Dodatku 1, je treba obravnavati kot prvo oceno. Opozoriti je treba, da lahko uporabnik pripravi oceno topnosti v vodi tudi z uporabo katerega koli razmerja, za katero se šteje, da bolje predstavlja razmerje med hidrofobnostjo in topnostjo. Priporoča se na primer, naj se za trdne spojine v napovedovanje topnosti vključi tališče. Če se uporabi spremenjena enačba, se je treba prepričati, da enačba za izračun topnosti v oktanolu še vedno velja. V Dodatku 2 je prikazana shema mešalne posode s stekleno oblogo, katere prostornina znaša približno en liter. Razmerja med merami posode, prikazane v Dodatku 2, so se izkazala za ugodna in jih je treba ohraniti, kadar se uporabi aparatura druge velikosti,

— bistveno je sredstvo za ohranjanje konstantne temperature med preskusom s počasnim mešanjem.

18. Posode morajo biti izdelane iz inertnega materiala, tako da je adsorpcija na površine posode zanemarljiva.

Priprava preskusnih raztopin

19. P_{OW} je treba določiti z najčistejšim 1-oktanolom, ki je na voljo na trgu (vsaj + 99-odstotnim). Priporoča se prečiščenje 1-oktanola z ekstrakcijo s kislino, bazo in vodo ter poznejšim sušenjem. Poleg tega se lahko 1-oktanol prečisti z destilacijo. Prečiščeni 1-oktanol se uporabi za pripravo standardnih raztopin preskusnih snovi. Voda, ki bo uporabljena pri določanju P_{OW}, mora biti destilirana v stekleni ali kremenčevi aparaturi ali pridobljena iz prečiščevalnega sistema, lahko pa se uporablja tudi voda HPLC-čistosti. Za destilirano vodo je potrebno filtriranje skozi filter z velikostjo por 0,22 μm. Vključiti je treba slepe vzorce, s čimer se zagotovi, da v koncentriranih ekstraktih ni nečistot, ki lahko interferirajo s preskusno snovjo. Če se uporablja filter iz steklenih vlaken, ga je treba očistiti s triurnim segrevanjem v peči pri 400 °C.

20. Pred preskusom se topili medsebojno nasitita z uravnoteženjem v dovolj veliki posodi. To se doseže tako, da se dvofazni sistem dva dneva počasi meša.

21. Izbrana ustrezna koncentracija preskusne snovi se raztopi v 1-oktanolu (nasičenem z vodo). Porazdelitveni koeficient 1-oktanol/voda je treba določiti v razredčenih raztopinah v 1-oktanolu in vodi. Zato koncentracija preskusne snovi ne sme presegati 70 % njene topnosti z največjo koncentracijo 0,1 M v kateri koli fazi (1). V raztopinah z 1-oktanolom, uporabljenih za preskus, ne sme biti suspendirane trdne preskusne snovi.

22. Ustrezna količina preskusne snovi se raztopi v 1-oktanolu (nasičenem z vodo). Če ocena log P_{OW} presega vrednost 5, je treba poskrbeti, da v raztopinah z 1-oktanolom, uporabljenih za preskus, ni suspendirane trdne preskusne snovi. V ta namen se upošteva postopek za kemikalije z ocenjeno vrednostjo log $P_{OW} > 5$:

— preskusna snov se raztopi v 1-oktanolu (nasičenem z vodo),

▼M4

— raztopina se pusti dovolj dolgo, da se suspendirana trdna snov posede. Med posedanjem se spremlja koncentracija preskusne snovi,

— ko izmerjene koncentracije v raztopini z 1-oktanolom dosežejo stabilne vrednosti, se osnovna raztopina razredči z ustreznim volumnom 1-oktanola,

— izmeri se koncentracija razredčene osnovne raztopine. Če je izmerjena koncentracija v skladu z razredčitvijo, se lahko razredčena osnovna raztopina uporabi v preskusu s počasnim mešanjem.

Ekstrakcija in analiza vzorcev

23. Za analizo preskusne snovi je treba uporabiti validirano analitsko metodo. Raziskovalci morajo zagotoviti dokaze, da so koncentracije v fazi 1-oktanola, nasičenega z vodo, in fazi vode, nasičene z 1-oktanolom, med preskusom nad mejo določljivosti uporabljenih analitskih postopkov. V primerih, v katerih so potrebne ekstrakcijske metode, je treba analitske izkoristke preskusne snovi iz vodne faze in faze 1-oktanola določiti pred preskusom. Analitski signal je treba popraviti za slepe vzorce in paziti, da prenos analita iz enega vzorca v drugega ni mogoč.

24. Pred analizo bosta zaradi dokaj nizkih koncentracij hidrofobnih preskusnih snovi v vodni fazi verjetno potrebna ekstrakcija iz vodne faze z organskim topilom in predkoncentriranje ekstrakta. Iz istega razloga je treba znižati morebitne koncentracije slepih vzorcev. V ta namen je treba uporabiti topila visoke čistosti, po možnosti topila za analizo ostankov. Poleg tega lahko navzkrižno kontaminacijo pomaga preprečiti delo s steklovino, ki se predhodno skrbno očisti (npr. s pomivanjem v topilu ali segrevanjem v peči pri zvišani temperaturi).

25. Ocena log P_{OW} se lahko pridobi s programom za ocenjevanje ali s strokovno presojo. Če je vrednost višja od 6, je treba skrbno spremljati popravke za slepe vzorce in prenos analita. Če ocena log P_{OW} presega 6, je obvezna uporaba nadomestnega standarda za popravek izkoristka, da je mogoče doseči visoke faktorje predkoncentracije. Na trgu so na voljo številni računalniški programi za ocenjevanje log P_{OW} [1], npr. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) in ACD log P (19). Opisi pristopov k ocenjevanju so na voljo v virih (20–22).

26. Meje določljivosti (LOQ) za ugotavljanje preskusne snovi v 1-oktanolu in vodi je treba določiti s sprejetimi metodami. Načeloma se lahko meja določljivosti metode določi kot koncentracija v vodi ali 1-oktanolu, katere razmerje med signalom in hrupom znaša 10. Izbrati je treba ustrezno metodo ekstrakcije in predkoncentriranja ter opredeliti analitske izkoristke. Izbere se ustrezen predkoncentracijski faktor, da se pri analitskem določanju dobi signal potrebne intenzivnosti.

[1] Te informacije so navedene samo za usmerjanje uporabnikov. Uporabijo se lahko tudi drugi enakovredni računalniški programi, če je mogoče dokazati, da dajejo enake rezultate.

▼M4

27. Na podlagi parametrov analitske metode in pričakovanih koncentracij se določi približna velikost vzorca, ki je potrebna za natančno določitev koncentracije spojine. Izogibati se je treba uporabi vzorcev vode, ki so premajhni za doseganje zadostnega analitskega signala. Prav tako se je treba izogibati prevelikim vzorcem vode, saj sicer lahko ostane premalo vode za najmanjše število zahtevanih analiz (n = 5). V Dodatku 1 so navedeni minimalni volumni vzorcev v odvisnosti od prostornine posode, LOD preskusne snovi in topnosti preskusne snovi.

28. Količinska določitev preskusnih snovi se izvede s primerjavo z umeritvenimi krivuljami zadevne spojine. Koncentracije v analiziranih vzorcih je treba razvrstiti glede na koncentracije standardov.

29. Za preskusne snovi z oceno log P_{OW}, višjo od 6, je treba vzorcu vode pred ekstrakcijo primešati nadomestni standard, da se ugotovijo izgube, ki se pojavijo med ekstrakcijo in predkoncentriranjem vzorcev vode. Za natančen popravek izkoristka morajo imeti nadomestki lastnosti, ki so zelo podobne ali celo enake lastnostim preskusne snovi. Po možnosti se za ta namen uporabljajo (stabilni) izotopno označeni analogi preiskovanih snovi (na primer devterirani analogi ali analogi, označeni z izotopom ^{13}C). Če uporaba označenih stabilnih izotopov, tj. ^{13}C ali ^{2}H, ni mogoča, je treba z opiranjem na zanesljive podatke v literaturi dokazati, da so fizikalno-kemijske lastnosti nadomestka zelo podobne lastnostim preskusne snovi. Med tekočinsko-tekočinsko ekstrakcijo vodne faze se lahko tvorijo emulzije. Njihovo nastajanje je mogoče zmanjšati tako, da se doda sol, emulzija pa pusti čez noč mirovati. O metodah, ki se uporabijo za ekstrahiranje in predkoncentriranje vzorcev, je treba poročati.

30. Vzorci, odvzeti iz faze 1-oktanola, se lahko pred analizo po potrebi razredčijo z ustreznim topilom. Poleg tega je uporaba nadomestnih standardov za popravek izkoristka priporočljiva za snovi, za katere so se v preskusih izkoristka pokazala velika odstopanja (relativni standardni odklon > 10 %).

31. O podrobnostih analitske metode je treba poročati. To vključuje metodo ekstrakcije, predkoncentracijske faktorje in faktorje redčenja, parametre instrumentov, postopek umerjanja, umeritveno območje, analitski izkoristek preskusne snovi iz vode, dodajanje nadomestnih standardov za popravek izkoristka, vrednosti slepih vzorcev, meje zaznavnosti in meje določljivosti.

Izvedba preskusa

Optimalna razmerja volumnov 1-oktanol/voda

32. Pri izbiri volumnov vode in 1-oktanola je treba upoštevati LOQ v 1-oktanolu in vodi, predkoncentracijske faktorje, uporabljene za vzorce vode, vzorčene volumne v 1-oktanolu in vodi ter pričakovane koncentracije. Za namene preskusa je treba volumen 1-oktanola v sistemu počasnega mešanja izbrati tako, da je plast 1-oktanola dovolj debela (> 0,5 cm), da omogoča vzorčenje faze 1-oktanola brez povzročanja motenj v njej.

33. Običajna fazna razmerja, uporabljena za določitve spojin, katerih log P_{OW} znaša 4,5 in več, so 20 do 50 ml 1-oktanola in 950 do 980 ml vode v litrski posodi.

▼M4

Preskusni pogoji

34. Med preskusom je reakcijska posoda termostatirana, da se temperaturne spremembe zmanjšajo pod 1 °C. Analizo je treba opraviti pri 25 °C.

35. Preskusni sistem je treba zaščititi pred dnevno svetlobo, bodisi tako, da se preskus izvaja v temnem prostoru, bodisi tako, da se reakcijska posoda pokrije z aluminijasto folijo.

36. Preskus je treba izvajati v brezprašnem okolju (kolikor je to mogoče).

37. Sistem 1-oktanol-voda se meša, dokler ni doseženo ravnotežje. V pilotnem preskusu se dolžina obdobja za vzpostavljanje ravnotežja oceni z izvedbo preskusa s počasnim mešanjem ter rednim vzorčenjem vode in 1-oktanola. Intervali vzorčenja morajo znašati najmanj pet ur.

38. P_{OW} je treba vsakič določiti z vsaj tremi neodvisnimi preskusi s počasnim mešanjem.

Določanje časa do vzpostavitve ravnotežja

39. Domneva se, da je ravnotežje doseženo, ko regresija razmerja koncentracij 1-oktanol/voda glede na čas v obdobju štirih časovnih točk da naklon, ki ne odstopa bistveno od nič pri vrednosti $p = 0,05$. Najkrajši čas do vzpostavitve ravnotežja je en dan pred začetkom vzorčenja. Načeloma se lahko vzorčenje snovi, katerih log P_{OW} je ocenjen na manj kot 5, opravi drugi in tretji dan. Pri bolj hidrofobnih spojinah bo morda treba vzpostavljanje ravnotežja podaljšati. Za spojino z log P_{OW} 8,23 (dekaklorobifenil) je bilo za uravnoteženje potrebnih 144 ur. Ravnotežje se oceni z večkratnim vzorčenjem v isti posodi.

Začetek preskusa

40. Na začetku preskusa se reakcijska posoda napolni z vodo, nasičeno z 1-oktanolom. Dopustiti je treba dovolj časa, da se doseže termostatirana temperatura.

41. Želena količina preskusne snovi (raztopljene v zahtevanem volumnu 1-oktanola, nasičenega z vodo) se pazljivo doda v reakcijsko posodo. To je ključni korak v preskusu, saj se je treba izogniti turbulentnemu mešanju obeh faz. V ta namen je treba fazo 1-oktanola s pipeto počasi dodajati na steno preskusne posode blizu vodne površine. Tako bo zadevna faza tekla stekla po steni in ustvarila film nad vodno fazo. Vedno se je treba izogibati odlivanju 1-oktanola neposredno v posodo; kapljice 1-oktanola ne smejo padati neposredno v vodo.

42. Po začetku mešanja je treba njegovo hitrost počasi povečevati. Če mešalnih motorjev ni mogoče ustrezno prilagoditi, je treba razmisliti o uporabi transformatorja. Hitrost mešanja je treba nastaviti tako, da se na prehodu med vodo in 1-oktanolom ustvari vrtinec, globok 0,5 do največ 2,5 cm. Hitrost mešanja je treba zmanjšati, če globina vrtinca preseže 2,5 cm; v nasprotnem primeru se lahko iz kapljic 1-oktanola v vodni fazi tvorijo mikrokapljice, kar privede do precenjevanja koncentracije preskusne snovi v vodi. Največja hitrost mešanja 2,5 cm se priporoča na podlagi ugotovitev primerjalne validacijske študije (5). Je kompromis med hitrim vzpostavljanjem ravnotežja in omejevanjem tvorbe mikrokapljic 1-oktanola.

▼M4

Vzorčenje in obdelava vzorcev

43. Pred vzorčenjem je treba mešalo izključiti in počakati, da se tekočine umirijo. Po končanem vzorčenju se mešalo počasi znova zažene, kot je opisano zgoraj, zatem pa se hitrost mešanja postopno povečuje.

44. Vodna faza se vzorči z uporabo petelinčka na dnu reakcijske posode. Mrtvi volumen vode, ki ga vsebuje pipica (pri posodi, prikazani v Dodatku 2, je to približno 5 ml), se vedno zavrže. Voda v pipici ni premešana in zato ni uravnotežena z glavnino. Volumen vzorcev vode je treba zabeležiti, paziti pa je treba, da se pri določanju masne bilance upošteva količina preskusne snovi v zavrženi vodi. Izgube zaradi izhlapevanja je treba čim bolj zmanjšati, tako da se pusti voda mirno teči v lij ločnik, ne da bi prišlo do motenj v plasti vode/1-oktanola.

45. Vzorci 1-oktanola se pridobijo tako, da se s 100-mikrolitrsko stekleno-kovinsko brizgo iz plasti 1-oktanola odvzame majhen alikvot (približno 100 μl). Paziti je treba, da se ne povzročijo motnje na prehodu faz. Volumen vzorčene tekočine se zabeleži. Zadošča že majhen alikvot, saj bo vzorec 1-oktanola razredčen.

46. Izogibati se je treba nepotrebnim korakom pri prenosu vzorcev. V ta namen je treba volumen vzorca določiti gravimetrično. Pri vzorcih vode se to lahko doseže tako, da se vzorec vode zbere v liju ločniku, ki že vsebuje zahtevani volumen topila.

PODATKI IN POROČANJE

47. V skladu s to preskusno metodo se P_{OW} določi tako, da se v enakih pogojih opravijo trije preskusi s počasnim mešanjem (tri preskusne enote) s preiskovano spojino. Regresija, ki se uporabi za dokaz doseženega ravnotežja, mora temeljiti na rezultatih vsaj štirih določitev C_O/C_W v zaporednih časovnih točkah. S tem se omogoči izračun variance kot merila nezanesljivosti povprečne vrednosti, dobljene v vsaki preskusni enoti.

48. P_{OW} se lahko označuje z varianco v dobljenih podatkih za vsako preskusno enoto. Ta podatek se uporabi za izračun P_{OW} kot tehtanega povprečja rezultatov posameznih preskusnih enot. V ta namen se kot utež uporabi obratna vrednost variance rezultatov preskusnih enot. Posledično imajo podatki z velikim odstopanjem (izraženim kot varianca) in torej manjšo zanesljivostjo manjši vpliv na rezultat kot podatki z majhno varianco.

49. Podobno se izračuna tehtani standardni odklon. Ta označuje ponovljivost merjenja P_{OW}. Nizka vrednost tehtanega standardnega odklona kaže, da je bilo določanje P_{OW} v okviru enega laboratorija zelo ponovljivo. Formalna statistična obdelava podatkov je opisana v nadaljevanju.

▼M4

Obdelava rezultatov

Dokaz doseženega ravnotežja

50. Logaritem razmerja koncentracij preskusne snovi v 1-oktanolu in vodi (log (C_O/C_w)) se izračuna za vsak čas vzorčenja. Doseženo kemijsko ravnotežje se dokaže z grafičnim prikazom tega razmerja glede na čas. Konstantna raven v tem grafičnem prikazu, ki temelji na vsaj štirih zaporednih časovnih točkah, kaže, da je bilo ravnotežje doseženo in da je spojina popolnoma raztopljena v 1-oktanolu. V nasprotnem primeru je treba preskus nadaljevati, dokler štiri zaporedne časovne točke ne dajo naklona, ki ne odstopa bistveno od nič pri vrednosti p = 0,05, kar kaže, da je log C_o/C_w neodvisen od časa.

Izračun log P_{OW}

51. Vrednost log P_{OW} preskusne enote se izračuna kot tehtana povprečna vrednost log C_o/C_w za tisti del krivulje log C_o/C_w v odvisnosti od časa, za katerega je bilo prikazano ravnotežje. Tehtano povprečje se izračuna z uteževanjem podatkov z obratno vrednostjo variance, tako da je vpliv podatkov na končni rezultat obratno sorazmeren z nezanesljivostjo podatkov.

Povprečni log P_{OW}

52. Povprečna vrednost log P_{OW} različnih preskusnih enot se izračuna kot povprečje rezultatov posameznih preskusnih enot, uteženih z njihovimi posameznimi variancami.

Izračun se opravi tako:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kjer je

$\log P_{OW,i}$ = vrednost log P_{OW} posamezne preskusne enote i;

$\log P_{OW,Av}$ = tehtana povprečna vrednost posameznih določitev log P_{OW};

w_i = statistična utež, dodeljena vrednosti log P_{OW} preskusne enote i.

Obratna vrednost variance log $P_{OW,i}$ se uporabi kot w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Napaka povprečne vrednosti log P_{OW} se oceni kot ponovljivost log C_o/C_w, določenega med fazo vzpostavljanja ravnotežja v posameznih preskusnih enotah. Izražena je kot tehtani standardni odklon log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), ki je merilo napake, povezane s $P_{OW,Av}$. Tehtani standardni odklon se lahko izračuna iz tehtane variance ($var_{\log Pow,Av}$) tako:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Simbol n predstavlja število preskusnih enot.

▼M4

Poročilo o preskusu

54. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna snov

— splošno ime, kemijsko ime, številko CAS, strukturno formulo (v kateri je naveden položaj označevalca, kadar je uporabljena izotopsko označena snov) in zadevne fizikalno-kemijske lastnosti (glej odstavek 17),

— čistost (nečistote) preskusne snovi,

— čistost označevalca označenih kemikalij in molarno aktivnost (kjer je ustrezno),

— predhodno oceno log P_{OW} in metodo, uporabljeno za izpeljavo vrednosti.

Preskusni pogoji

— datume izvajanja študij,

— temperaturo med preskusom,

— volumne 1-oktanola in vode na začetku preskusa,

— volumne odvzetih vzorcev 1-oktanola in vode,

— volumne 1-oktanola in vode, ki so preostali v preskusnih posodah,

— opis uporabljenih preskusnih posod in pogojev mešanja (geometrija mešalne palice in preskusne posode, globina vrtinca v mm in, kadar je na voljo, hitrost mešanja),

— uporabljene analitske metode za določanje preskusne snovi in meje določljivosti metod,

— čase vzorčenja,

— pH vodne faze in uporabljene pufre, kadar se pH prilagodi za molekule, ki lahko ionizirajo,

— število ponovitev.

Rezultati

— ponovljivost in občutljivost uporabljenih analitskih metod,

— ugotovljene koncentracije preskusne snovi v 1-oktanolu in vodi v odvisnosti od časa,

— prikaz masne bilance,

— temperaturo in standardni odklon ali temperaturno območje med preskusom,

— regresijo razmerja koncentracij v odvisnosti od časa,

— povprečno vrednost log $P_{OW,Av}$ in njeno standardno napako,

— razpravo in razlago rezultatov,

▼M4

— primere surovih podatkov reprezentativne analize (vse surove podatke je treba shraniti v skladu s standardi dobre laboratorijske prakse), vključno z izkoristki nadomestkov, številom ravni, uporabljenih v umerjanju (skupaj z merili za korelacijski koeficient umeritvene krivulje), in rezultate zagotavljanja/nadzora kakovosti (QA/QC),

— kadar je na voljo, validacijsko poročilo o postopku analize (ki se navede med viri).

VIRI:

(1) De Bruijn, J. H. M., Busser, F., Seinen, W., Hermens, J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring“ method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

(2) Poglavje A.8 te priloge, Porazdelitveni koeficient.

(3) Poglavje A.8 te priloge, Porazdelitveni koeficient.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Pariz.

(5) Tolls, J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling, R. S., Mackay, D. (ur.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, ZDA.

(7) Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., Imboden, D. M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold, C. G., Widenhaupt, A., David, M. M., Müller, S. R., Haderlein, S. B., Schwarzenbach, R. P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. Environ. Sci. Technol. 31: 2596–2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Pariz.

(10) Poglavje A.6 te priloge, Topnost v vodi.

(11) Poglavje C.7 te priloge, Razgradnja – abiotska razgradnja: hidroliza kot funkcija pH.

(12) Poglavje C.4 – deli II–VII (metode A do F) te priloge, Določanje „dobre“ biorazgradljivosti.

(13) Poglavje A.4 te priloge, Parni tlak.

(14) Pinsuwan, S., Li, A., in Yalkowsky, S. H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, J. Chem. Eng. Data. 40: 623–626.

(15) Lyman, W. J. (1990). Solubility in water. V: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H., (ur.) American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 do 2-52.

(16) Leo, A., Weininger, D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan, W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budimpešta.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman, W. J. (1990). Octanol/water partition coefficient. V: Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H. (ur.). Handbook of chemical property estimation, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker, R. F., de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 14: 479–488.

(22) Jübermann, O. (1958). Houben-Weyl (ur.), Methoden der Organischen Chemie: 386–390.

▼M4

Dodatek 1

Preglednice za izračun najmanjših volumnov vode, potrebnih za zaznavanje preskusnih snovi z različnimi vrednostmi log P_{ow} v vodni fazi

Predpostavke:

— največji volumen posameznih alikvotov = 10 % skupnega volumna; 5 alikvotov = 50 % skupnega volumna,

— koncentracija preskusnih snovi = 0,7 × topnost v kateri koli fazi. V primeru nižjih koncentracij so potrebni večji volumni,

— volumen, uporabljen za določitev LOD = 100 ml,

— log P_{OW} v odvisnosti od log S_W in log P_{OW} v odvisnosti od SR (S_{OKT}/S_W) smiselno predstavljata razmerja za preskusne snovi.

Ocena S_w

log P_{ow}	enačba	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–3,192	6,427E-04

Ocena S_{okt}

log P_{ow}	enačba	S_{okt} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Skupna masa preskusne snovi (mg)	$masa_{okt}/masa_{voda}$	$masa_{H2O}$ (mg)	$konc_{H2O}$ (mg/l)	$masa_{okt}$ (mg)	$konc_{okt}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Izračun volumnov

Najmanjši potrebni volumen za fazo H_2O pri vsaki koncentraciji LOD

log K_{ow}	LOD (mikrogrami/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volumen, uporabljen za LOD (I)	0,1					

Ključ za izračune

Predstavlja < 10 % skupnega volumna vodne faze, litrska posoda za vzpostavljanje ravnotežja.

Predstavlja < 10 % skupnega volumna vodne faze, 2-litrska posoda za vzpostavljanje ravnotežja.

Predstavlja < 10 % skupnega volumna vodne faze, 5-litrska posoda za vzpostavljanje ravnotežja.

Predstavlja < 10 % skupnega volumna vodne faze, 10-litrska posoda za vzpostavljanje ravnotežja.

Presega 10 % celo 10-litrske posode za vzpostavljanje ravnotežja.

▼**M4**

Pregled potrebnih volumnov v odvisnosti od topnosti v vodi in log P_{OW}

Najmanjši potrebni volumen za fazo H_2O pri vsaki koncentraciji LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrami/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

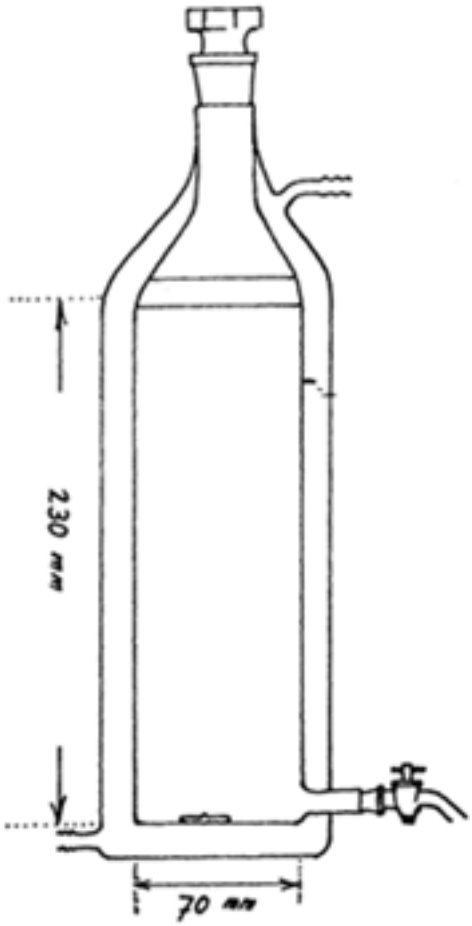
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrami/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volumen, uporabljen za LOD (I)		0,1					

▼M4

Dodatek 2

Primer preskusne posode s stekleno oblogo za preskus s počasnim mešanjem za določanje P_{OW}



▼M6

A.24 PORAZDELITVENI KOEFICIENT (N-OKTANOL/VODA), METODA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 117 (2004).

1. Porazdelitveni koeficient (P) je opredeljen kot razmerje ravnotežnih koncentracij (c) raztopljene snovi v dvofaznem sistemu, sestavljenem iz dveh topil, ki se v glavnem ne mešata. V primeru n-oktanola in vode:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{voda}}}$$

Porazdelitveni koeficient (P) je količnik dveh koncentracij, je brez enote in se navadno navede v obliki logaritma z osnovo 10.

2. V študijah usode kemičnih snovi v okolju je P_{ow} ključni parameter. Dokazano je zelo značilno razmerje med koeficientom P_{ow} neionizirane oblike snovi in bioakumulacijo teh oblik snovi v ribah. Dokazano je bilo tudi, da je koeficient P_{ow} uporaben parameter pri napovedovanju adsorpcije v tleh in usedlinah ter pri določitvi kvantitativnih razmerij med strukturo in aktivnostjo za širok nabor bioloških učinkov.

3. Prvotni predlog za to preskusno metodo je temeljil na članku C. V. Eadsfortha in P. Moserja (1). Razvoj preskusne metode in preskus s primerjavo med laboratoriji OECD je usklajevala Zvezna agencija za okolje Zvezne republike Nemčije v letu 1986 (2).

ZAČETNI POMISLEKI

4. Vrednosti log P_{ow} v območju od – 2 do 4 (občasno pa do 5 in več) ([1]) je mogoče določiti s poskusi z metodo stresanja bučke (poglavje A.8 te priloge, Smernica za preskušanje OECD 107). Metoda HPLC zajema vrednost log P_{ow} v območju od 0 do 6 (1)(2)(3)(4)(5). Za določitev primernih referenčnih snovi in v podporo morebitnim zaključkom, ki se izpeljejo iz podatkov, pridobljenih s preskusom, je pri tej metodi morda potrebno ocenjevanje P_{ow}. Računske metode so na kratko obravnavane v Dodatku k tej preskusni metodi. Način delovanja HPLC je izokratski.

5. Vrednosti P_{ow} so odvisne od okoljskih pogojev, kot so temperatura, pH, ionska moč itd., za pravilno razlago podatkov P_{ow} pa morajo biti ti pogoji v poskusu opredeljeni. Pri snoveh, ki disociirajo na ione, bo morda na voljo druga metoda (npr. osnutek smernice OECD o metodi merjenja pH za ionizirane snovi (6)), ki bi jo bilo mogoče uporabljati kot alternativno. Čeprav je pri snoveh, ki disociirajo na ione, osnutek smernice OECD morda primeren za določanje P_{ow}, je v nekaterih primerih primerneje uporabiti metodo HPLC pri okoljsko ustreznem pH (glej odstavek 9).

([1]) Zgornja meja je določena s potrebo po doseganju popolne faze separacije po prilagoditvah ravnotežja porazdelitve in preden so odvzeti vzorci za analitske določitve. Ob zadostni pazljivosti je mogoče zgornjo mejo razširiti na višje vrednosti P_{ow}.

▼**M6**

NAČELO METODE

6. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo se izvaja z analitskimi kolonami, napolnjenimi z na trgu dostopno trdno fazo, ki vsebuje dolge verige ogljikovodikov (npr. C8, C18), vezane na silicijev dioksid.

7. Kemikalijo, injicirano na tako kolono, po koloni prenaša mobilna faza; med tem prenosom se kemikalija porazdeli med mobilno fazo topila in stacionarno fazo ogljikovodika. Snovi se zadržijo sorazmerno s svojim porazdelitvenim koeficientom ogljikovodik/voda, pri čemer se prve eluirajo hidrofilne snovi, zadnje pa lipofilne. Retencijski čas opisuje faktor kapacitete k, ki je določen z enačbo:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

pri čemer je t_R retencijski čas preskusne snovi, t_0 pa mrtvi čas, tj. povprečni čas, ki ga molekula topila potrebuje, da pride skozi kolono. Kvantitativna analiza ni potrebna, treba je določiti le retencijske čase.

8. Porazdelitveni koeficient oktanol/voda preskusne snovi je mogoče izračunati z določitvijo njegovega faktorja kapacitete k s poskusi in nato z vnosom faktorja k v naslednjo enačbo:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

pri čemer sta:

a, b = koeficienta linearne regresije.

Zgornjo enačbo je mogoče izračunati z linearno regresijo logaritma porazdelitvenih koeficientov oktanol/voda referenčnih snovi glede na logaritem faktorjev kapacitete referenčnih snovi.

9. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo je mogoče porazdelitvene koeficiente oceniti v območju vrednosti log P_{ow} med 0 in 6, kar je v izjemnih primerih mogoče razširiti tako, da zajame območje vrednosti log P_{ow} med 6 in 10. Zaradi tega je morda treba prilagoditi mobilno fazo (3). Ta metoda ni uporabna za močne kisline in baze, kovinske komplekse, snovi, ki reagirajo z eluentom, ali površinsko aktivne snovi. Meritve je na neionizirani obliki snovi, ki disociirajo na ione (prosta kislina ali prosta baza), mogoče izvesti le z uporabo ustreznega pufra s pH, ki je pri prosti kislini najmanj eno enoto pod vrednostjo pK_a, pri prosti bazi pa najmanj eno enoto nad vrednostjo pK_a. Namesto tega bo morda na voljo metoda merjenja pH za preskušanje snovi, ki disociirajo na ione (6); to metodo bi bilo mogoče uporabljati kot alternativno (6). Če je vrednost log P_{ow} določena za uporabo pri razvrščanju nevarnosti za okolje ali ocenjevanju okoljskega tveganja, je treba preskus izvesti v območju pH, ki ustreza naravnemu okolju, tj. v območju pH od 5,0 do 9.

10. V nekaterih primerih lahko nečistote otežijo razlago rezultatov, ker postanejo določitve vrhov negotove. Za zmesi, ki dajo nedoločen pas, je treba sporočiti zgornjo in spodnjo mejo vrednosti log P_{ow} ter površinski odstotek vsakega vrha vrednosti log P_{ow}. Pri zmeseh, ki so skupina homologov, mora biti navedeno tudi tehtano povprečje vrednosti log P_{ow} (7), izračunano na podlagi posameznih vrednosti koeficienta P_{ow} in ustreznih vrednosti površinskega odstotka (8). Vse vrhove, ki k skupni površini vrhov prispevajo površino 5 % ali več, je treba upoštevati pri izračunu (9):

▼M6

$$\textit{tehtano povprečje } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{površina \%})}{\textit{skupna površina vrhov \%}} = \frac{\sum (\textit{log } P_{owi})(\textit{površina \%}_i)}{\sum_i \textit{površina \%}}$$

Tehtano povprečje vrednosti log P_{ow} velja le za snovi ali zmesi (npr. talova olja), ki so sestavljene iz homologov (npr. vrste alkanov). Zmesi je mogoče meriti in pri tem dobiti smiselne rezultate, če ima uporabljeni analitski detektor enako občutljivost na vse snovi v zmesi in jih v zadostni meri razločuje.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

11. Disociacijska konstanta, strukturna formula in topnost v mobilni fazi morajo biti znane pred uporabo metode. Poleg tega bi bile v pomoč informacije o hidrolizi.

MERILA KAKOVOSTI

12. Za povečanje zanesljivosti meritve je treba izvesti dve vzporedni določitvi.

— Ponovljivost: vrednost log P_{ow}, določena s ponavljajočimi se meritvami, izvedenimi v enakih pogojih in z uporabo enake skupine referenčnih snovi, mora biti v območju ± 0,1 log enot.

— Obnovljivost: če so meritve ponovljene z drugo skupino referenčnih snovi, se rezultati lahko razlikujejo. Običajno je korelacijski koeficient R za razmerje med vrednostma log k in log P_{ow} za skupino preskusnih snovi približno 0,9, kar ustreza porazdelitvenemu koeficientu oktanol/voda vrednosti log P_{ow} ± 0,5 log enot.

13. Preskus s primerjavo med laboratoriji je dokazal, da je mogoče z metodo HPLC pridobiti vrednosti log P_{ow} do ± 0,5 enote vrednosti, dobljenih z metodo stresanja bučke (2). Druge primerjave je mogoče najti v literaturi (4)(5)(10)(11)(12). Najbolj natančne rezultate dajo korelacijske krivulje, ki temeljijo na strukturno sorodnih referenčnih snoveh (13).

REFERENČNE SNOVI

14. Za določitev soodvisnosti izmerjenega faktorja kapacitete (k) snovi in njenega koeficienta P_{ow} je treba izdelati umeritveno krivuljo z uporabo najmanj 6 referenčnih točk (glej odstavek 24). Uporabnik sam izbere primerne referenčne snovi. Referenčne snovi morajo običajno imeti vrednosti log P_{ow}, ki zajemajo vrednosti log P_{ow} preskusne snovi, tj. mora biti koeficient P_{ow} pri vsaj eni referenčni snovi večji, kot ga ima preskusna snov, pri vsaj eni drugi pa mora biti koeficient P_{ow} manjši, kot ga ima preskusna snov. Ekstrapolacija se uporablja le izjemoma. Zaželeno je, da so te referenčne snovi strukturno sorodne preskusni snovi. Vrednosti log P_{ow} referenčnih snovi, ki se uporabljajo za kalibracijo, morajo temeljiti na zanesljivih preskusnih podatkih. Vendar pa se lahko za snovi z visoko vrednostjo log P_{ow} (običajno večjo od 4) uporabljajo izračunane vrednosti, razen če so na voljo zanesljivi preskusni podatki. Če se uporabljajo ekstrapolirane vrednosti, mora biti navedena mejna vrednost.

15. Na voljo so izčrpni seznami vrednosti log P_{ow} za številne skupine kemikalij (14)(15). Če ni podatkov o porazdelitvenih koeficientih strukturno sorodnih snovi, se lahko uporabi bolj splošna kalibracija, določena z drugimi referenčnimi snovmi. Priporočene referenčne snovi in njihove vrednosti P_{ow} so navedene v preglednici 1. Za snovi, ki disociirajo na ione, dane vrednosti veljajo za neionizirano obliko. Med preskusom s primerjavo med laboratoriji sta bili preverjeni verodostojnost in kakovost vrednosti.

▼**M6**

Preglednica 1

Priporočene referenčne vrednosti

	Številka CAS	Referenčna snov	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanon (metil etil keton)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridin	0,5	
3	62-53-3	anilin	0,9	
4	103-84-4	acetanilid	1,0	
5	100-51-6	benzil alkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	fenoksiocetna kislina	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	benzonitril	1,6	
11	140-29-4	fenilacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzil alkohol	1,6	
13	98-86-2	acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzojska kislina	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-kloroanilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	cinamil alkohol (cimetov alkohol)	1,9	
19	65-85-0	benzojska kislina	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	cimetova kislina	2,1	pKa = 3,89 (cis) *4*,44 (trans)
22	100-66-3	anizol	2,1	
23	93-58-3	metil benzoat	2,1	
24	71-43-2	benzen	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzojska kislina	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	trikloroetilen	2,4	
28	1912-24-9	atrazin	2,6	
29	93-89-0	etil benzoat	2,6	

▼**M6**

	Številka CAS	Referenčna snov	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-diklorobenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-klorobenzojska kislina	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dikloroanilin	2,8	
35	108-90-7	klorobenzen	2,8	
36	1746-13-0	alil fenil eter	2,9	
37	108-86-1	bromobenzen	3,0	
38	100-41-4	etilbenzen	3,2	
39	119-61-9	benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklorobenzen	3,4	
43	122-39-4	difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	naftalen	3,6	
45	93-99-2	fenil benzoat	3,6	
46	98-82-8	izopropilbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	bifenil	4,0	
49	120-51-4	benzil benzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklorobenzen	4,2	
52	143-07-7	dodekanojska kislina	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	difenileter	4,2	
54	85-01-8	fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzen	4,6	
56	103-29-7	dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridin	4,9	
58	206-44-0	fluoranten	5,1	
59	603-34-9	trifenilamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

OPIS METODE

Predhodna ocena porazdelitvenega koeficienta

16. Po potrebi se lahko porazdelitveni koeficient oceni, po možnosti z računsko metodo (glej Dodatek) ali, kadar je primerno, na podlagi razmerja topnosti preskusne snovi v čistih topilih.

Naprava

17. Potreben je tekočinski kromatograf, opremljen z nizkozmogljivostno črpalko in primernim detektorjem. Detektor UV z valovno dolžino 210 nm ali detektor RI je mogoče uporabiti pri različnih kemijskih skupinah. Prisotnost polarnih skupin v stacionarni fazi lahko resno zmanjša učinkovitost kolone HPLC. Zato mora imeti stacionarne faze le minimalni odstotek polarnih skupin (16). Lahko se uporabijo na trgu dostopna mikropolnila za kolone za kromatografijo z reverzno fazo ali že pripravljene kolone. Med injektorskim sistemom in analitsko kolono se lahko namesti predkolona.

Mobilna faza

18. Topilo za eluiranje se pripravi iz metanola za HPLC in deionizirane vode ter se pred uporabo razplini. Uporabiti je treba izokratsko elucijo. Uporabiti je treba razmerja metanol/voda z deležem vode najmanj 25 %. Običajno je zmes metanol/voda v razmerju 3: 1 (v/v) zadovoljiva za eluiranje snovi z log P = 6 v eni uri pri pretoku 1 ml/min. Pri snoveh, katerih vrednost log P je 6 ali več (in referenčnih snoveh), bo morda treba elucijski čas skrajšati z zmanjšanjem polarnosti mobilne faze ali skrajšanjem kolone.

19. Preskusne in referenčne snovi morajo biti topne v mobilni fazi v zadostnih koncentracijah, da je omogočena njihova detekcija. Dodatke v zmesi metanol/voda je mogoče uporabiti le izjemoma, saj spremenijo lastnosti kolone. V teh primerih mora biti potrjeno, da ni prišlo do vpliva na retencijski čas preskusnih in referenčnih snovi. Če zmes metanol/voda ni primerna, je mogoče uporabiti druge zmesi topilo/voda, npr. etanol/voda, acetonitril/voda ali izopropil alkohol (2-propanol)/voda.

20. Pri snoveh, ki disociirajo na ione, je pH eluenta zelo pomemben. Biti mora v delovnem območju pH kolone, ki je običajno med 2 in 8. Priporočeno je dodajanje pufra. Preprečiti je treba obarjanje soli in razpadanje kolone, ki lahko nastaneta pri nekaterih zmeseh organske faze in pufra. Meritve HPLC s stacionarnimi fazami z osnovo iz silicijevega dioksida in pH nad 8 običajno niso priporočljive, saj uporaba alkalne mobilne faze lahko povzroči hitro poslabšanje učinkovitosti kolone.

Topljenci

21. Za dodeljevanje vrhov v kromatogramih ustreznim snovem morajo biti preskusne in referenčne snovi dovolj čiste. Snovi, ki se bodo uporabile za preskus ali kalibracijo, se po možnosti raztopijo v mobilni fazi. Če je za topljenje preskusnih in referenčnih snovi uporabljeno drugo topilo, ne mobilna faza, mora biti mobilna faza uporabljena pri končnem redčenju pred injiciranjem.

Preskusni pogoji

22. Med merjenjem se temperatura ne sme spreminjati za več kot ± 1 °C.

▼M6

Določanje mrtvega časa t_o

23. Mrtvi čas t_0 je mogoče izračunati z organskimi spojinami, ki se ne zadržijo v koloni (npr. tiosečnino ali formamidom). Natančnejšo vrednost mrtvega časa je mogoče izpeljati iz izmerjenih retencijskih časov ali z nizom približno sedmih spojin homologne vrste (n-alkilmetil-ketoni) (17). Izriše se krivulja dobljenih retencijskih časov t_R (n_C + 1) v odvisnosti od t_R (n_C), pri čemer je n_C število ogljikovih atomov. Dobljena je ravna črta, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, pri čemer je A, ki predstavlja k(n_C + 1)/k(n_C), konstanta. Mrtvi čas t_0 je dobljen iz presečišča (1 – A)t_0 in naklona A.

Regresijska enačba

24. Naslednji korak je izdelava krivulje vrednosti log k v odvisnosti od log P za ustrezne referenčne snovi, pri čemer morajo biti vrednosti log P blizu pričakovane vrednosti za preskusno snov. V praksi se od 6 do 10 referenčnih snovi injicira hkrati. Določijo se retencijski časi, po možnosti na zapisovalnem integratorju, povezanem z detektorjem. Ustrezni logaritmi faktorjev kapacitete, log k, se izrišejo kot krivulja v odvisnosti od log P. V rednih časovnih razmikih, vsaj enkrat dnevno, se izračunava regresijska enačba, tako da je mogoče upoštevati morebitne spremembe v učinkovitosti kolone.

DOLOČITEV KOEFICIENTA P_{OW} PRESKUSNE SNOVI

25. Preskusna snov se injicira v najmanjših še zaznavnih količinah. Retencijski čas se določa v dvojniku. Porazdelitveni koeficient preskusne snovi je pridobljen z interpolacijo izračunanega faktorja kapacitete na umeritveni krivulji. Pri zelo majhnih in zelo velikih porazdelitvenih koeficientih je potrebna ekstrapolacija. V takih primerih je treba še posebej upoštevati meje zaupanja regresijske premice. Če je retencijski čas vzorca zunaj obsega retencijskih časov, pridobljenih za standarde, je treba navesti mejno vrednost.

PODATKI IN POROČANJE

Poročilo o preskusu

26. Poročilo mora vsebovati naslednje:

— predhodno oceno porazdelitvenega koeficienta, če je določena, ocenjene vrednosti in uporabljeno metodo, če je bila uporabljena računska metoda, pa tudi njen celotni opis, vključno z določitvijo zbirke podatkov in podrobnimi informacijami o izbiri fragmentov,

— preskusne in referenčne snovi: čistost, strukturno formulo in številko CAS,

— opis opreme in delovnih pogojev: analitske kolone, predkolone,

— mobilno fazo, detekcijsko sredstvo, temperaturni razpon, pH,

— elucijske diagrame (kromatograme),

— mrtvi čas in podatke o tem, kako je bil izmerjen,

— podatke o retenciji in vrednosti log P_{ow} iz literature za referenčne snovi, uporabljene za kalibracijo,

— podrobnosti o prilagojeni regresijski premici (log k v odvisnosti od log P_{ow}) in korelacijski koeficient premice, vključno z intervali zaupanja,

▼**M6**

— podatke o povprečni retenciji in interpolirano vrednost log P_{ow} za preskusno snov,

— v primeru zmesi: elucijski diagram/kromatogram z označenimi mejnimi vrednostmi,

— vrednosti log P_{ow} v odvisnosti od površinskega odstotka vrha log P_{ow},

— izračun z uporabo regresijske premice,

— izračun tehtanega povprečja vrednosti log P_{ow}, kadar je to primerno.

LITERATURA

(1) Eadsforth, C. V., in Moser, P. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) Klein, W., Kördel, W., Weiss, M., in Poremski, H. J. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) Eadsforth, C. V. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) Ellgehausen, H., D'Hondt, C., in Fuerer, R. (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) McDuffie, B. (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Osnutek smernice, november 2000.

(7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995“, Oslo and Pariz Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Priloga 10, Oviedo, od 20. do 24. februarja 1995.

(8) Thatcher, M., Robinson, M., Henriquez, L. R., in Karman, C. C. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Različica 1.0, 3. avgust.

(9) Vik, E. A., Bakke, S., in Bansal, K. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, str. 529–537.

(10) Renberg, L. O., Sundstroem, S. G., in Sundh-Nygård, K. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) Hammers, W. E., Meurs,G. J., in De-Ligny, C. L. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) Haky, J. E., in Young, A. M. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) Fujisawa, S., in Masuhara, E. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) Hansch, C., in Leo, A. J. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) Hansch, C., predsednik; Leo, A. J., dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – Na voljo v projektu Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) Rekker, R. F., de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

(17) Berendsen, G. E., Schoenmakers, P. J., de Galan, L., Vigh, G., Varga-Puchony, Z., in Inczédy, J. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Dodatek

Računske metode P_{OW}

UVOD

1. V tem dodatku je kratek uvod v izračun koeficienta P_{ow}. Več informacij za bralca je v literaturi (1)(2).

2. Izračunane vrednosti P_{ow} se uporabljajo za:

   — odločanje o tem, katero eksperimentalno metodo uporabiti: metodo stresanja bučke za vrednosti log P_{ow} med – 2 in 4 in metodo HPLC za vrednosti log P_{ow} med 0 in 6,

   — izbiro pogojev za uporabo pri metodi HPLC (referenčnih snovi, razmerja metanol/voda),

   — preverjanje sprejemljivosti vrednosti, pridobljenih z eksperimentalnimi metodami,

   — določanje ocene, kadar preskusnih metod ni mogoče uporabiti.

Načelo računskih metod

3. Tu predlagane računske metode temeljijo na teoretični fragmentaciji molekule na ustrezne podstrukture, za katere so znane zanesljive vrednosti povečanja log P_{ow}. Vrednost log P_{ow} je pridobljena s seštevanjem vrednosti fragmentov in členov korekcije za intramolekularne interakcije. Na voljo so seznami konstant fragmentov in členov korekcije (1)(2)(3)(4)(5)(6). Nekateri se redno dopolnjujejo (3).

Zanesljivost izračunanih vrednosti

4. Na splošno se zanesljivost računskih metod manjša z večanjem kompleksnosti proučevane snovi. Pri enostavnih molekulah z majhno molekulsko maso in eno ali dvema funkcionalnima skupinama se lahko pričakuje odstopanje med rezultati različnih metod fragmentacije in izmerjenimi vrednostmi, ki znaša od 0,1 do 0,3 enote log P_{ow}. Območje napake je odvisno od zanesljivosti konstant fragmentov, zmožnosti prepoznavanja intramolekularnih interakcij (npr. vodikovih vezi) in pravilne uporabe členov korekcije. Pri snoveh, ki lahko ionizirajo, je pomembno, da se pravilno upošteva naboj ali stopnja ionizacije (10).

Metoda Fujita-Hansch π

5. Konstanta hidrofobnih substituentov, π, ki so jo vpeljali Fujita in drugi (7), je opredeljena kot:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

pri čemer je PhX porazdelitveni koeficient aromatskega derivata in PhH porazdelitveni koeficient izhodne spojine.

$$\begin{aligned} \text{npr.}\quad ^{\pi}Cl &= \log\ Pow\ (C6H5Cl) - \log\ P_{ow}\ (C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

Metoda π je uporabna predvsem za aromatske snovi. Na voljo so vrednosti π za veliko število substituentov (4)(5).

Rekkerjeva metoda

6. Z Rekkerjevo metodo (8) se vrednost log P_{ow} izračuna na naslednji način:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{členi interakcije})$$

▼M6

pri čemer a_i pomeni pogostnost pojavljanja danega fragmenta v molekuli, f_i pa je vrednost povečanja log P_{ow} fragmenta. Členi interakcije se lahko izrazijo kot skupni zmnožek ene same konstante C_m (tako imenovane „magične konstante“). Konstante fragmentov f_i in C_m so določene na podlagi seznama 1 054 vrednosti P_{ow}, dobljenih s poskusi z multiplo regresijsko analizo, ki so zajemali 825 spojin (6)(8). Členi interakcije se določijo v skladu s pravili, opisanimi v literaturi (6)(8)(9).

Hansch-Leova metoda

7. S Hansch-Leovo metodo (4) se vrednost log P_{ow} izračuna po enačbi:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

pri čemer f_i predstavlja konstante različnih fragmentov molekule, F_j je člen korekcije (faktor), a_i in b_j pa sta ustrezni pogostnosti pojavljanja. Z metodo poskusa in napake ter z izpeljavo iz vrednosti P_{ow}, dobljenih s poskusi, sta bila sestavljena seznam vrednosti za atome in skupine ter seznam členov korekcije F_j. Členi korekcije so bili razvrščeni v več različnih razredov (1)(4). Za upoštevanje vseh pravil in členov korekcije so bili razviti programski paketi (3).

KOMBINIRANA METODA

8. Izračunavanje log P_{ow} kompleksnih molekul se lahko znatno izboljša, če se molekula razdeli na večje podstrukture, za katere so na voljo zanesljive vrednosti log P_{ow} iz preglednic (3)(4) ali iz obstoječih meritev. Taki fragmenti (npr. heterocikli, antrakinon, azobenzen) se nato lahko kombinirajo s Hanschevimi vrednostmi π ali z Rekkerjevimi ali Leovimi konstantami fragmentov.

Opombe

(i) Računske metode se za delno ali popolnoma ionizirane snovi lahko uporabijo le, kadar je mogoče upoštevati potrebne korekcijske faktorje.

(ii) Če se lahko predpostavlja, da so prisotne intramolekularne vodikove vezi, je treba prišteti ustrezne člene korekcije (pribl. od + 0,6 do + 1,0 enot log P_{ow}) (1). Znaki prisotnosti takih vezi se lahko pridobijo iz stereo modelov ali spektroskopskih podatkov o molekuli.

(iii) Če je možnih več tavtomernih oblik, mora izračun temeljiti na najbolj verjetni obliki.

(iv) Pozorno je treba spremljati spremembe seznamov konstant fragmentov.

LITERATURA O RAČUNSKIH METODAH

(1) Lyman, W. J., Reehl, W. F., in Rosenblatt, D. H. (ur.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) Dunn, W. J., Block, J. H., in Pearlman, R. S. (ur.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) in Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, ZDA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) Hansch, C., in Leo, A. J. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, A. J, Hansch, C., in Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) Rekker, R. F., de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa in Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) Rekker, R. F. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) Eadsforth, C. V., in Moser, P. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) Scherrer, R. A. ACS – Symposium Series 255, str. 225, American Chemical Society, Washington, D. C. (1984).

▼M7

A.25 DISOCIACIJSKE KONSTANTE V VODI (TITRACIJSKA METODA – SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA – KONDUKTOMETRIČNA METODA)

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 112 (1981).

Predpogoji

— Ustrezna analitska metoda

— Topnost v vodi

Napotki

— Strukturna formula

— Električna prevodnost za konduktometrično metodo

Omejitvene izjave

— Vse preskusne metode se lahko izvedejo na čistih snoveh ali snoveh komercialne čistosti. Upoštevati je treba morebitne učinke nečistot na rezultate.

— Titracijska metoda ni primerna za slabo topne snovi (glej Preskusne raztopine v nadaljevanju).

— Spektrofotometrična metoda se uporablja le za snovi, ki imajo precej drugačen absorpcijski spekter UV/vidne svetlobe za disociirane in nedisociirane oblike. Ta metoda je lahko primerna tudi za slabo topne snovi in nekislinsko-bazične disociacije, npr. tvorbo kompleksa.

— V primerih, v katerih drži Onsagerjeva enačba, se lahko konduktometrična metoda uporablja tudi pri razmeroma nizkih koncentracijah in celo v primerih nekislinsko-bazičnega ravnotežja.

Standardni dokumenti

Ta preskusna metoda temelji na metodah iz virov, navedenih v oddelku „Viri“, in na Predhodnem osnutku smernic za prijavo nove snovi (Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification) Agencije za varstvo okolja ZDA (EPA), 18. avgust 1978.

METODA – UVOD, NAMEN, PODROČJE UPORABE, POMEN, UPORABA IN OMEJITVE PRESKUSA

Pri oceni vpliva snovi na okolje je pomembna njena disociacija v vodi. Ta vpliva na obliko snovi, ki določa njeno vedenje in transport. Lahko vpliva na adsorpcijo kemikalije v tla in sedimente ter absorpcijo v biološke celice.

Opredelitve in enote

Disociacija je reverzibilen razcep v eno ali več kemijskih oblik, ki so lahko ionske. Proces je običajno označen z enačbo:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

in konstanta ravnotežnih koncentracij, ki vpliva na reakcijo, je

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Na primer v posebnem primeru, v katerem je R vodik (snov je kislina), je konstanta:

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

ali

$$pK_\alpha = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referenčne snovi

Naslednjih referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakič, ko se preučuje nova snov. Navedene so zlasti zato, da se lahko občasno izvede kalibracija metode ter da se lahko v primeru uporabe druge metode primerjajo rezultati.

	pK_a ([1])	Temp. v °C
p-nitrofenol	7,15	25 ([1])
benzojska kislina	4,12	20
p-kloroanilin	3,93	20

([1]) Za 20 °C vrednost ni na voljo, vendar se lahko predvideva, da je variabilnost rezultatov meritev večja kot pričakovana odvisnost od temperature.

Koristno bi bilo imeti snov z več vrednostmi pK, kot je navedeno v Načelu metode v nadaljevanju. Taka snov bi lahko bila:

citronska kislina	pK_a (8)	Temp. v °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Načelo preskusne metode

Opisani kemijski proces je na splošno le malo odvisen od temperature v okoljsko ustreznem temperaturnem območju. Za določanje konstante disociacije je potrebno merjenje koncentracij disociiranih in nedisociiranih oblik kemijske snovi. Ustrezna konstanta se lahko določi na podlagi poznavanja stehiometrije disociacijske reakcije, kot je navedeno v Opredelitvah in enotah. V posebnem primeru, opisanem pri tej preskusni metodi, se snov vede kot kislina ali baza, in najprimernejši način za določitev je ugotovitev relativnih koncentracij ioniziranih in neioniziranih oblik snovi ter vrednosti pH raztopine. Razmerje med temi elementi se izračuna po enačbi za pK_a, ki je navedena v Opredelitvah in enotah. Nekatere snovi imajo več kot eno konstanto disociacije in razviti je mogoče podobne enačbe. Nekatere tukaj opisane metode so primerne tudi za disociacijo nekislin/baz.

Merila kakovosti

Ponovljivost

Konstanto disociacije bi bilo treba ponoviti (najmanj tri določanja) v območju ± 0,1 logaritemske enote.

OPIS PRESKUSNEGA POSTOPKA

Za določitev vrednosti pK_a obstajata dva osnovna pristopa. Eden vključuje titracijo znane količine snovi s standardno kislino ali bazo, kot je ustrezno; drugi pa ugotovitev relativne koncentracije ioniziranih in neioniziranih oblik ter njihove odvisnosti od vrednosti pH.

▼M7

Priprave

Metode, ki temeljijo na navedenih načelih, se lahko razvrstijo kot titracija, spektrofotometrični in konduktometrični postopek.

Preskusne raztopine

Pri titracijski in konduktometrični metodi je treba kemično snov raztopiti v destilirani vodi. Pri spektrofotometrični metodi in drugih metodah se uporabljajo pufrske raztopine. Koncentracija preskusne snovi ne sme presegati 0,01 M ali polovice koncentracije nasičenosti in pri pripravi raztopin je treba uporabiti najčistejšo obliko snovi, ki je na voljo. Če je snov le težko topna, se lahko raztopi v majhni količini topila, ki se meša z vodo, preden se doda k zgoraj navedenim koncentracijam.

Z uporabo Tyndallovega pramena svetlobe je treba preveriti, ali so v raztopinah prisotne emulzije, zlasti če je bilo za povečanje topnosti uporabljeno sotopilo. Kadar se uporabljajo pufrske raztopine, koncentracija pufra ne bi smela presegati 0,05 M.

Preskusni pogoji

Temperatura

Temperaturo je treba nadzorovati pri vsaj ± 1 °C. Določanje bi bilo treba po možnosti izvesti pri 20 °C.

Če obstaja sum odvisnosti od temperature, je treba določanje izvesti pri vsaj še dveh drugih temperaturah. V tem primeru morajo biti temperaturni intervali 10 °C, nadzor temperature pa pri ± 0,1 °C.

Analize

Metoda se določi glede na naravo snovi, ki se preskuša. Biti mora dovolj občutljiva, da se lahko pri vsaki posamezni koncentraciji preskusne raztopine določijo različne oblike.

Izvedba preskusa

Titracijska metoda

Preskusna raztopina se določi s titracijo s raztopino standardne baze ali kisline, kot je ustrezno, pri čemer se po vsakem dodajanju titranta izmeri vrednost pH. Pred ekvivalentno točko ga je treba posamično dodati vsaj desetkrat. Če je ravnotežje doseženo dokaj hitro, se lahko uporabi zapisovalni potenciometer. Pri tej metodi mora biti natančno znana skupna količina snovi in njena koncentracija. Izvajati je treba ukrepe za preprečitev vdora ogljikovega dioksida. Podrobnosti o postopku, ukrepih in izračunu so navedene v standardnih preskusih, npr. v virih (1) (2) (3) (4).

Spektrofotometrična metoda

Kadar se koeficienti ekstinkcije ioniziranih in neioniziranih oblik snovi znatno razlikujejo, se določi valovna dolžina. Absorpcijski spekter UV/vidne svetlobe se pridobi iz raztopin s konstantno koncentracijo pri vrednosti pH, pri kateri je snov v glavnem neionizirana in popolnoma ionizirana, ter pri več vmesnih vrednostih pH. To je mogoče izvesti bodisi tako, da se v razmeroma veliko količino raztopine snovi v večkomponentnem pufru postopoma dodaja koncentrirana kislina (baza), sprva pri visoki (nizki) vrednosti pH (ref. 5), bodisi tako, da se v konstantne količine različnih pufrskih raztopin, ki obsegajo želeni razpon vrednosti pH, dodajajo enake količine osnovne raztopine snovi v npr. vodi, metanolu. Zadostno število vrednosti za pK_a se iz vrednosti pH in absorbance pri izbrani valovni dolžini izračuna tako, da se uporabijo podatki za vsaj 5 vrednosti pH, pri katerih je snov ionizirana v razponu od vsaj 10 % do manj kot 90 %. Nadaljnje podrobnosti o preskusu in metodi izračuna so na voljo v viru (1).

▼M7

Konduktometrična metoda

Z uporabo celice z majhno, znano celično konstanto se izmeri prevodnost približno 0,1 M raztopine snovi v prevodni vodi. Izmerijo se tudi prevodnosti določenega števila natančno narejenih razredčitev te raztopine. Koncentracija se vsakič prepolovi, serije pa bi morale obsegati vsaj en red velikosti v koncentraciji. Omejena prevodnost pri neskončni razredčitvi se ugotovi z izvedbo podobnega poskusa z natrijevo soljo in ekstrapolacijo. Nato se lahko z Onsagerjevo enačbo iz prevodnosti vsake raztopine izračuna stopnja disociacije, iz česar se lahko z Ostwaldovim zakonom razredčenja izračuna konstanta disociacije po enačbi $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, pri čemer je C koncentracija v molih na liter, α pa disociirana frakcija. Izvajati je treba ukrepe za preprečitev vdora CO_2. Nadaljnje podrobnosti o preskusu in metodi izračuna so na voljo v standardnih besedilih ter virih (1) (6) (7).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Titracijska metoda

Vrednost pK_a se izračuna za 10 merjenih točk na titracijski krivulji. Izračunata se odklon srednje vrednosti in standardni odklon takih vrednosti pK_a. Poleg predstavitve v preglednicah bi bilo treba vključiti grafični prikaz vrednosti pH glede na volumen standardne baze ali kisline.

Spektrofotometrične metode

Absorbanco in vrednost pH je treba za vsak spekter predstaviti v preglednicah. Vsaj pet vrednosti za vrednost pK_a se izračuna iz podatkovnih točk znotraj spektra, izračunata se tudi srednja vrednost in standardni odklon teh rezultatov.

Konduktometrična metoda

Za vsako koncentracijo kisline in vsako koncentracijo mešanice enega ekvivalenta kisline in 0,98 ekvivalenta natrijevega hidroksida brez karbonatov, se izračuna ekvivalent prevodnosti Λ. Kislina je v presežku, da se prepreči presežni OH^- zaradi hidrolize. Razmerje $1 / \Lambda$ je grafično prikazano glede na $\sqrt{C}$ in Λ_o soli se lahko ugotovi z ekstrapolacijo na nično koncentracijo.

Vrednost Λ_o kisline se lahko izračuna z uporabo vrednosti za H^+ in Na^+ iz virov. Vrednost pK_a za vsako koncentracijo se lahko izračuna po enačbi $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ in $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$. Za K_a se lahko dobijo boljše vrednosti s popravki za mobilnost in aktivnost. Izračunati bi bilo treba srednjo vrednost in standardni odklon vrednosti pK_a.

Poročilo o preskusu

Vse neobdelane podatke in izračunane vrednosti pK_a je treba predložiti skupaj z metodo izračuna (po možnosti v obliki preglednic, kot je predlagano v ref. 1) ter opisanimi statističnimi parametri. Pri titracijski metodi je treba navesti podrobnosti o standardizaciji titrantov.

Pri spektrofotometrični metodi je treba navesti vse spektre. Pri konduktometrični metodi je treba poročati o podrobnostih določanja konstante celice. Navesti bi bilo treba informacije o uporabljeni tehniki, analitski metodi in naravi vseh uporabljenih pufrov.

Poročati bi bilo treba o preskusnih temperaturah.

VIRI

(1) Albert, A. in Sergeant, E. P. (1962). *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York.

▼**M7**

(2) Nelson, N. H. in Faust, S. D. (1969). Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, str. 1186–1188.

(3) ASTM D 1293 (1974). Annual ASTM Standards, Philadelphia.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14. izdaja, American Public Health Association, Washington, D. C., 1976.

(5) Clark, J. in Cunliffe, A. E. (marec 1973). Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281.

(6) ASTM D 1125 (1974). Annual ASTM Standards, Philadelphia.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (glej (4) zgoraj).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60. izdaja. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

DEL B: METODE ZA DOLOČANJE TOKSIČNOSTI IN DRUGIH UČINKOV NA ZDRAVJE

KAZALO

SPLOŠNI UVOD

B.1 bis. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – POSTOPEK S TOČNO DOLOČENIM ODMERKOM

B.1 tris. AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – METODA RAZREDOV AKUTNE TOKSIČNOSTI

B.2 AKUTNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU

B.3 AKUTNA STRUPENOST (V STIKU S KOŽO)

B.4 AKUTNO DRAŽENJE KOŽE/JEDKOST ZA KOŽO

B.5 AKUTNO DRAžENJE OČI/JEDKOST ZA OČI

B.6 SENZIBILIZACIJA KOŽE

B.7 28-DNEVNA ŠTUDIJA ORALNE STRUPENOSTI S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI NA GLODAVCIH

B.8 SUBAKUTNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU: 28-DNEVNA ŠTUDIJA

B.9 STRUPENOST (V STIKU S KOŽO) PRI PONAVLJAJOČEM SE ODMERKU (28 DNI)

B.10 IN VITRO PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ PRI SESALCIH

B.11 PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V KOSTNEM MOZGU SESALCEV

B.12 PRESKUS MIKRONUKLEUSOV V ERITROCITIH SESALCEV

B.13/14 MUTAGENOST: PREIZKUS POVRATNE MUTACIJE PRI BAKTERIJAH

B.17 *IN VITRO* PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENOV HPRT IN XPRT

B.21 PRESKUSI CELIČNE TRANSFORMACIJE SESALSKIH CELIC *IN VITRO*

B.22 PRESKUS DOMINANTNE SMRTNOSTI NA GLODAVCIH

▼B

B.23	PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V SPERMATOGONIJIH SESALCEV
B.25	PRESKUS DEDNE TRANSLOKACIJE NA MIŠIH
B.26	PRESKUS SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI 90-DNEVNA ŠTUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI NA GLODALCIH
B.27	PRESKUS SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI 90-DNEVNA ŠTUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI S PONAVLJAJOČMI SE ODMERKI NA NEGLODALCIH
B.28	ŠTUDIJA SUBKRONIČNE STRUPENOSTI V STIKU S KOŽO90-DNEVNA ŠTUDIJA S PONOVLJENIM DERMALNFM ODMERKOM NA GLODALCIH
B.29	SUBKRONIČNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU: 90-DNEVNA ŠTUDIJA
B.30	ŠTUDIJE KRONIČNE STRUPENOSTI
B.31	ŠTUDIJA STRUPENOSTI ZA PREDROJSTVENI RAZVOJ
B.32	ŠTUDIJE RAKOTVORNOSTI
B.33	KOMBINIRANE ŠTUDIJE KRONIČNE STRUPENOSTI/RAKOTVORNOSTI
B.34	PRESKUS STRUPENOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE NA ENI GENERACIJI
B.35	ŠTUDIJA DVOGENERACIJSKE REPRODUKTIVNE STRUPENOSTI
B.36	TOKSIKOKINETIKA
B.37	ZAPOZNELA NEVROTOKSIČNOST ORGANOFOSFORNIH SNOVI PO AKUTNI IZPOSTAVLJENOSTI
B.38	ZAPOZNELA NEVROTOKSIČNOST ORGANOFOSFORNIH SNOVI – 28-DNEVNA ŠTUDIJA S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI
B.39	PREIZKUS NENAČRTNE SINTEZE DNA (UDS) V JETRNIH CELICAH SESALCEV *IN VIVO*
B.40	JEDKOST ZA KOŽO *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA TRANSKUTANE ELEKTRIČNE UPORNOSTI (TER)
B.40 bis	JEDKOST ZA KOŽO *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE
B.41	PRESKUS FOTOTOKSIČNOSTI 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42	PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK

▼B

B.43	ŠTUDIJA NEVROTOKSIČNOSTI NA GLODALCIH
B.44	ABSORPCIJA SKOZI KOŽO: METODA *IN VIVO*
B.45	ABSORPCIJA SKOZI KOŽO: METODA *IN VITRO*
B.46	PRESKUS DRAŽENJA KOŽE *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE
B.47	PRESKUSNA METODA ZA DOLOČANJE MOTNJAVE IN PREPUSTNOSTI ROŽENICE GOVEDA ZA OPREDELITEV I) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN II) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI
B.48	PRESKUSNA METODA NA IZOLIRANIH OČEH PIŠČANCEV ZA OPREDELITEV I) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN II) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI
B.49	*IN VITRO* PRESKUS MIKRONUKLEUSOV NA CELICAH SESALCEV
B.50	PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK: DA
B.51	PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK: BRDU-ELISA
B.52	AKUTNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU – METODA RAZREDOV AKUTNE STRUPENOSTI
B.53	ŠTUDIJA RAZVOJNE NEVROTOKSIČNOSTI
B.54	UTEROTROPNI BIOLOŠKI PRESKUS NA GLODAVCIH: KRATKOTRAJNI PRESEJALNI PRESKUS ZA ESTROGENE LASTNOSTI
B.55	HERSHBERGERJEV BIOLOŠKI PRESKUS NA PODGANAH: KRATKOTRAJNI PRESEJALNI PRESKUS ZA (ANTI)ANDROGENE LASTNOSTI
B.56.	RAZŠIRJENA ENOGENERACIJSKA ŠTUDIJA STRUPENOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE
B.57	PRESKUS STEROIDOGENEZE CELIC H295R
B.58	PRESKUS GENSKIH MUTACIJ NA SOMATSKIH IN KLIČNIH CELICAH GENSKO SPREMENJENIH GLODAVCEV
B.59	PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN CHEMICO*: NEPOSREDNI PRESKUS REAKTIVNOSTI PEPTIDOV (DPRA)
B.60	PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: LUCIFERAZNA PRESKUSNA METODA Z ARE-NRF2
B.61	PRESKUSNA METODA UHAJANJA FLUORESCEINA ZA OPREDELJEVANJE JEDKIH IN ZELO DRAŽILNIH SNOVI ZA OČI
B.62	KOMETNI PRESKUS *IN VIVO* V ALKALNIH POGOJIH PRI SESALCIH

▼B

B.63	PRESEJALNI PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ
B.64	KOMBINIRANA ŠTUDIJA TOKSIČNOSTI PRI PONOVLJENIH ODMERKIH S PRESEJALNIM PRESKUSOM TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ
B.65	*IN VITRO* PRESKUSNA METODA MEMBRANSKE PREGRADE V ZVEZI Z JEDKOSTJO ZA KOŽO
B.66	*IN VITRO* PRESKUSI TRANSAKTIVACIJE S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV
B.67	*IN VITRO* PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENA ZA TIMIDIN KINAZO
B.68	*IN VITRO* PRESKUSNA METODA KRATKOTRAJNE IZPOSTAVLJENOSTI ZA OPREDELITEV (i) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN (ii) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI
B.69	PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU (RhCE), ZA OPREDELITEV KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI
B.70	*IN VITRO*PRESKUSI S ČLOVEŠKIMI REKOMBINANTNIMI ESTROGENSKIMI RECEPTORJI (hrER) ZA ZAZNAVO KEMIKALIJ Z VEZAVNO AFINITETO ZA ER
B.71	PRESKUSI *IN VITRO* ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE, S KATERIMI SE OBRAVNAVA KLJUČNI DOGODEK AKTIVACIJE DENDRITSKIH CELIC PRI POTEKU NEŽELENEGA IZIDA (AOP) ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE

▼B

SPLOŠNI UVOD

A. **OPREDELITEV PRESKUSNE SNOVI**

Pred začetkom katere koli študije toksičnosti je treba poznati sestavo preskusne snovi, vključno z glavnimi nečistotami in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki vključujejo tudi stabilnost.

Fizikalno-kemijske lastnosti preskusne snovi zagotavljajo pomembne informacije za izbiro načina vnosa, načrtovanje posamezne študije ter za rokovanje in skladiščenje preskusne snovi.

Pred začetkom študije je treba razviti analitično metodo za kvalitativno in kvantitativno določitev preskusne snovi (vključno z glavnimi nečistotami, kjer je mogoče) v sredstvu za odmerjanje in biološkem materialu.

Poročilo o preskusu naj vključuje vse informacije v zvezi z identifikacijo, fizikalno-kemijskimi lastnostmi, čistostjo in obnašanjem preskusne snovi.

B. **VARSTVO ŽIVALI**

Pri preskušanju toksičnosti sta bistvenega pomena izvajanje stroge kontrole nad okoljskimi razmerami in uporaba primernih tehnik za varstvo živali.

(i) *Nastanitveni pogoji*

Okoljske razmere v preskuševalnih živalskih prostorih ali ogradah morajo biti primerne za preskusno vrsto. Za podgane, miši in morske prašičke so primerne razmere sobna temperatura 22 ^{o}C ± 3 ^{o}C z relativno vlažnostjo od 30 % do 70 %; za kunce naj bi bila temperatura 20 ± 3 ^{o}C z relativno vlažnostjo od 30 do 70 %.

Nekatere preskusne tehnike so še posebno občutljive za temperaturne učinke in v takih primerih so podrobnosti o ustreznih razmerah vključene v opis preskusne metode. Pri vseh raziskavah toksičnih učinkov je treba temperaturo in vlažnost spremljati, zabeležiti in vključiti v končno poročilo o študiji.

Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Podrobnosti o vzorcu osvetlitve je treba zabeležiti in vključiti v končno poročilo o študiji.

Razen, če metoda določa drugače, se lahko živali nastanijo v kletke posamično ali v majhnih skupinah istega spola; pri skupinski nastanitvi je v kletki lahko največ pet živali.

Pomembno je, da je v poročilih o poskusih na živalih navedena vrsta uporabljene nastanitve v kletkah in število nastanjenih živali v vsaki kletki med izpostavljenostjo kemikaliji in tudi v vsakem poznejšem obdobju opazovanja.

▼B

(ii) *Prehranjevalni pogoji*

Hrana naj izpolnjuje vse prehranjevalne zahteve preskusne živalske vrste. Če se preskusne snovi dajejo živalim z njihovo hrano, lahko interakcija med snovjo in sestavino hrane zmanjša hranilno vrednost. Možnost take reakcije je treba upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa. Konvencionalna laboratorijska hrana se lahko uporablja z neomejenimi količinami pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne snovi, če se ta snov daje s hrano.

Kontaminanti v hrani, ki lahko vplivajo na toksičnost, ne smejo biti v koncentracijah, ki lahko povzročijo motnje.

C. **ALTERNATIVNO PRESKUŠANJE**

Evropska unija je zavezana k spodbujanju razvoja in preverjanja alternativnih tehnik, ki lahko zagotavljajo enako raven informacij kot trenutni živalski preskusi, vendar uporabljajo manjše število živali, povzročajo manj trpljenja ali se povsem izognejo uporabi živali.

Ko bodo takšne metode na razpolago, se bodo morale upoštevati, kjer je mogoče, za opredelitev nevarnosti ter posledično razvrstitev in označitev glede na njihovo dejansko nevarnost.

D. **OCENJEVANJE IN INTERPRETACIJA**

Ker je treba pri ocenjevanju in interpretaciji preskusov upoštevati omejitve, znotraj katerih se lahko rezultati živalskih študij in študij *in vitro* neposredno ekstrapolirajo na človeka, se lahko dokazi o škodljivih učinkih za človeka, če so na razpolago, uporabijo za potrditev rezultatov preskusa.

E. **SKLICEVANJE NA LITERATURO**

Večina teh metod je bila razvita v okviru programa OECD – smernice za preskušanje in jih je treba izvajati v skladu z načeli dobre laboratorijske prakse, da bi bilo kar najbolje zagotovljeno „medsebojno priznavanje podatkov“.

Dodatne informacije se lahko najdejo v napotilih, navedenih v smernicah za preskušanje OECD, in drugi ustrezni literaturi.

▼B

B.1 bis. **AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – POSTOPEK S TOČNO DOLOČENIM ODMERKOM**

1. **METODA**

Ta preskusna metoda ustreza OECD TV 420 (2001)

1.1 UVOD

Tradicionalne metode za ocenjevanje akutne toksičnosti upoštevajo pogin živali kot končno točko. Leta 1984 je Britansko društvo za toksikologijo predlagalo nov pristop k preskušanju akutne toksičnosti na podlagi dajanja serije točno določenih odmerkov (1). Ta pristop se je izognil uporabi pogina živali kot končne točke in se namesto tega oprl na opazovanje jasnih znakov toksičnosti na eni seriji velikosti točno določenih odmerkov. Po študijah v Združenem kraljestvu (2) in mednarodnih (3) validacijskih študijah *in vivo* se je sprejel postopek kot metoda za preskušanje v letu 1992. Kasneje so se statistične lastnosti Postopka s točnim odmerkom ovrednotile z uporabo matematičnih modelov v seriji študij (4)(5)(6). Tako študije *in vivo* kot študije na modelih so pokazale, da je postopek ponovljiv, da se zanj uporablja manj živali in da povzroča manj trpljenja kakor tradicionalne metode, ter da je z njim mogoče razvrstiti snovi na podoben način kot z drugimi metodami preskušanja akutne toksičnosti.

Navodila za izbiro najustreznejše metode preskušanja za dani namen se lahko poiščejo v Dokumentu s smernicami in navodili za preskušanje akutne oralne toksičnosti (7). Ta dokument z navodili vsebuje tudi dodatne informacije o izvajanju in razlagi metode preskušanja B.1 bis.

Princip metode je, da se v glavni študiji uporabljajo le zmerno toksični odmerki in se je treba izogibati dajanju odmerkov, za katere se pričakuje, da so smrtni. Prav tako se ne sme dajati odmerkov, za katere je znano, da povzročajo vidno bolečino in trpljenje živali zaradi jedkega ali močno dražečega delovanja. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo ali kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtijo na human način in se upoštevajo pri razlagi rezultatov preskusa na enak način kot živali, ki so poginile med preskusom. Kriterije za sprejem odločitve o usmrtitvi umirajočih živali ali živali, ki zelo trpijo, ter napotke za prepoznavanje napovedljive ali neizbežne smrti obravnava poseben Dokument s smernicami (8).

Z metodo pridobimo informacije o nevarnih lastnostih in nam omogoča uvrstitev in razvrstitev snovi v skladu z Globalno usklajenim sistemom (GHS) za razvrščanje kemikalij, ki povzročajo akutno toksičnost (9).

Laboratorij za preskušanje mora upoštevati vse razpoložljive informacije o preskusni snovi pred opravljanjem študije. Takšne informacije bodo vključevale vrsto in kemijsko sestavo snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na snovi, *in vitro* ali *in vivo;* toksikološke podatke o strukturno sorodnih snoveh ter pričakovano uporabo/uporabe snovi. Te informacije so potrebne, da vsem, ki jih to zadeva, zagotovijo, da je preskus pomemben za zaščito zdravja ljudi in da bo v pomoč pri izbiri ustreznega začetnega odmerka.

▼B

1.2 DEFINICIJE

Akutna oralna toksičnost: nanaša se na tiste škodljive učinke, ki sledijo dajanju enega odmerka snovi ali dajanju več odmerkov v 24 urah.

Kasnejša smrt: pomeni, da žival ne pogine ali da ne kaže znakov, da bo poginila, v 48 urah, vendar pogine kasneje med 14-dnevnim obdobjem opazovanja.

Odmerek: je količina dane preskusne snovi. Odmerek je izražen kot masa preskusne snovi na enoto teže preskusne živali (npr. mg/kg).

Očitna toksičnost: je splošen izraz, ki opisuje jasne znake toksičnosti po dajanju preskusne snovi (glej (3) na primer), takšne, da se pojavijo pri naslednjem najvišjem točno določenem odmerku hude bolečine in trajne znake hude stiske, stanje umiranja (kriteriji so navedeni v Dokumentu s smernicami za humane končne točke (8)), ali pa, če je mogoče pričakovati smrtnost pri večini živali.

GHS: Globalno usklajeni sistem razvrščanja kemijskih snovi in mešanic. Skupna aktivnost OECD (zdravje ljudi in okolje), Odbora ZN strokovnjakov za prevoz nevarnega blaga (fizikalno-kemijske lastnosti) in ILO (poročanje o nevarnih snovem) in koordinirana med organizacijami s Programom za pravilno ravnanje s kemikalijami (IOMC).

Neizbežna smrt: ko se pričakuje umirajoče stanje ali smrt pred naslednjim planiranim časom opazovanja. Značilni znaki tega stanja pri glodalcih lahko vključujejo krče, bočni položaj, poležavanje in tremor. (Glej Dokument s smernicami z navodili za humane končne točke (8) za podrobne podatke).

LD_{50} (srednji smrtni odmerek): je statistično ugotovljen enkraten odmerek snovi, za katerega se lahko pričakuje, da bo povzročil smrt pri 50 odstotkih živali, kadar se jim da po oralni poti. Vrednost LD_{50} se izrazi z maso preskusne snovi na enoto teže preskusne živali (mg/kg).

Mejni odmerek: nanaša se na odmerek na zgornji omejitvi preskušanja (2 000 ali 5 000 mg/kg).

Umirajoče stanje: stanje umiranja ali nezmožnosti preživeti, kljub tretiranju. (Glej Dokument s smernicami humane končne točke (8) za več podrobnih podatkov).

Pričakovana smrt: prisotnost kliničnih znakov, ki kažejo na smrt ob znanem času v prihodnosti pred načrtovanim zaključkom eksperimenta, na primer: živali niso sposobne doseči vode ali hrane. (Glej Dokument s smernicami z navodili za humane končne točke (8) za več podrobnih podatkov).

▼B

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Skupini živali istega spola se dajejo odmerki postopoma, z uporabo točno določenih odmerkov 5, 50, 300 in 2 000 mg/kg (izjemoma se lahko uporabi dodaten točno določen odmerek 5 000 mg/kg, glej oddelek 1.6.2). Začetna velikost odmerka se izbere na podlagi opazovalne študije kot odmerek, pri katerem se pričakuje, da se bodo pokazali nekateri znaki toksičnosti, ne da bi povzročil resne toksične posledice ali smrtnost. Klinični znaki in stanja, povezana z bolečino, trpljenjem in neizbežno smrtjo, so natančno napisana v posebnem OECD Dokument s smernicami (8). Nadaljnje skupine živali lahko dobivajo višje ali nižje točno določene odmerke, odvisno od prisotnosti ali odsotnosti znakov toksičnosti ali smrtnosti. Ta postopek se nadaljuje, dokler se ne ugotovi odmerka, ki povzroči očitno toksičnost ali več kot eno smrt, ali takrat, ko pri najvišjem odmerku ni videti nobenih učinkov, ali kadar nastopijo smrti pri najnižjem odmerku.

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Izbira živalskih vrst**

Najbolj cenjena vrsta glodalca je podgana, čeprav se lahko uporabijo tudi druge vrste glodalcev. Običajno se uporabljajo samice (7). To je zato, ker v literaturi poročila o običajnih LD_{50} preskusih kažejo, da je v občutljivosti med spoloma le malo razlik, vendar so v tistih primerih, kjer se razlike opažajo, samice na splošno neznatno bolj občutljive (10). Če pa iz poznavanja toksikoloških in toksikokinetičnih lastnosti strukturno sorodnih kemikalij izhaja, da je verjetno, da so samci bolj občutljivi, je treba uporabiti ta spol. Kadar se preskus opravlja na samcih, je treba imeti za to ustrezno obrazložitev.

Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Samice morajo biti nuliparne in ne smejo biti breje. Živali morajo biti na začetku odmerjanja stare od 8 do 12 tednov, njihova teža pa se mora gibati v intervalu ± 20 % povprečne teže katerih koli živali, ki so predhodno prejemale odmerek.

1.4.2 **Pogoji bivanja in hranjenja**

Temperatura eksperimentalnega prostora za živali mora znašati 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, razen med čiščenjem prostora, 50 do 60 %. Osvetlitev mora biti umetna, v zaporedju 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporabijo običajne predpisane laboratorijske vrste hranjenja z neomejeno količino pitne vode. Živali se lahko razporedijo v kletke po skupinah glede na odmerek, vendar število živali v vsaki kletki ne sme vplivati na neovirano opazovanje vsake živali.

1.4.3 **Priprava živali**

Živali se izberejo naključno, označijo se zato, da je možna individualna identifikacija in se zaprejo v kletke najmanj 5 dni pred začetkom odmerjanja, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram.

▼B

1.4.4 **Priprava odmerkov**

Na splošno je treba preskusne snovi dajati v konstantnem volumnu v območju odmerkov, ki jih je treba preskusiti s spreminjanjem koncentracije odmerjenega pripravka. Kadar je treba preskusiti tekoč končni produkt ali mešanico, pa je uporaba nerazredčene preskusne snovi, npr. pri konstantni koncentraciji, morda ustreznejša za naknadno oceno tveganja navedene snovi, in jo nekateri regulatorni organi zahtevajo. Maksimalni volumen odmerka se v nobenem primeru ne sme preseči. Maksimalni volumen tekočine, ki se jo lahko da naenkrat, je odvisen od velikosti preskusne živali. Pri glodalcih volumen običajno ne bi smel presegati 1 ml/100 g telesne teže, pri vodnih raztopinah pa se lahko upošteva 2 ml/100 g telesne teže. Glede na formulacijo pripravka za odmerjanje je priporočena, kadar koli je to mogoče, uporaba vodne raztopine/suspenzije/emulzije v olju (npr. v koruznem olju), sledi, po preferenčnem vrstnem redu, raztopina/suspenzija/emulzija v olju (npr. koruznem olju) in nato po možnosti raztopina v drugih nosilcih. Za nosilce, ki niso voda, je treba poznati toksikološke lastnosti nosilca. Odmerke je treba pripraviti tik pred dajanjem, razen kadar je znana stabilnost pripravka za obdobje, v katerem bo uporabljen, in je znano, da je sprejemljiva.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 **Dajanje odmerkov**

Preskusna snov se daje v enem odmerku z gavažo z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. V neobičajnih razmerah, ko enkraten odmerek ni mogoč, lahko odmerek dajemo v manjših frakcijah v obdobju, ki ne presega 24 ur.

Živali se morajo pred odmerjanjem postiti (npr. podgani je treba odtegniti hrano čez noč, vode pa ne; miš ne sme dobiti hrane 3 do 4 ure prej, vodo pa lahko). Po obdobju postenja je treba živali stehtati in jim dati preskusno snov. Po dajanju preskusne snovi se lahko odtegne hrana podganam za nadaljnje 3–4 ure ali mišim za 1–2 uri. Kadar se odmerek daje v frakcijah ves čas, je možno, da bo potrebno oskrbovati živali s hrano in vodo, odvisno od trajanja časovnega obdobja.

1.5.2 **Opazovalna študija**

Namen opazovalne študije je omogočanje izbire ustreznega začetnega odmerka za glavno študijo. Preskusna snov se daje posameznim živalim v zaporedju v skladu s tabelo poteka v Dodatku 1. Opazovalna študija se zaključi, ko se lahko sprejme odločitev o začetnem odmerku za glavno študijo (ali, če se opazi smrt pri najnižjem, točno določenem odmerku).

Začetni odmerek za opazovalno študijo se izbere izmed velikosti točno določenega odmerka 5, 50, 300 in 2 000 mg/kg kot odmerek, za katerega se pričakuje, da bo povzročil očitno toksičnost na podlagi, kadar je to mogoče, dokazov iz podatkov *in vivo* in *in vitro* za isto kemikalijo in za strukturno sorodne kemikalije. Če takšnih informacij ni, bo začetni odmerek 300 mg/kg.

Med odmerjanjem za vsako žival bo dovoljeno obdobje najmanj 24 ur. Vse živali je treba opazovati najmanj 14 dni.

▼B

Izjemoma in le tedaj, kadar je to upravičeno zaradi posebnih regulatornih potreb, se lahko upošteva dodatna večja velikost točno določenega odmerka 5 000 mg/kg (glej Dodatek 3). Zaradi skrbi za zaščito živali je preskušanje živali v območjih kategorije GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg) nezaželeno in ga je treba upoštevati le, kadar obstaja velika verjetnost, da imajo rezultati takšnega preskušanja neposreden pomen za zaščito zdravja ljudi ali živali ali za okolje.

Kadar žival, preskušana v opazovalni študiji z najnižjo velikostjo točno določenega odmerka (5 mg/kg) pogine, je običajen postopek tak, da se študija zaključi in snov razvrsti v kategorijo GHS 1 (kot je prikazano v Dodatku 1). Če pa je potrebna nadaljnja potrditev razvrščanja, se lahko izvede neobvezen nadomestni postopek na naslednji način. Drugi živali se odmeri 5 mg/kg. Če druga žival pogine, se bo kategorija GHS 1 potrdila in študija se bo nemudoma zaključila. Če druga žival preživi, se bo dajal odmerek 5 mg/kg največ trem dodatnim živalim. Ker bo nevarnost smrtnosti velika, je treba tem živalim dajati odmerek na zaporeden način, da se zaščiti zdravje živali. Časovni interval med odmerjanjem vsaki živali bi moral biti dovolj dolg, da se ugotovi verjetnost, da bo predhodna žival preživela. Če se zgodi druga smrt, se bo zaporedje odmerjanja nemudoma končalo in odmerjanja za nadaljnje živali ne bo. Zaradi druge smrti (ne glede na število živali, preskušanih v času zaključka) se uvrsti v izid A (2 smrti ali več), upošteva se pravilo o razvrstitvi iz Dodatka 2 za 5 mg/kg točno določenega odmerka (kategorija 1, če sta smrti 2 ali če jih je več, ali kategorija 2, če je več kot 1 smrt). Dodatek 4 poleg tega daje napotke o razvrstitvi v sistem EU, dokler se ne začne izvajati novi GHS sistem.

1.5.3 **Glavna študija**

1.5.3.1 *Število živali in velikosti odmerkov*

Ukrepe, ki jih je treba izvesti po preskušanju z začetno velikostjo odmerka, prikazujejo tabele poteka v Dodatku 2. Potreben bo eden od treh ukrepov; ustavitev preskušanja in uvrstitev v ustrezen razred razvrstitve nevarnih snovi, preskus z večjim točno določenim odmerkom ali preskus z manjšim točno določenim odmerkom. Za zaščito živali pa se velikost odmerka, ki je povzročil smrt v opazovalni študiji, ne bo ponovila v glavni študiji (glej Dodatek 2). Izkušnje kažejo, da je najverjetnejši izid z začetno velikostjo odmerka tak, da se snov lahko razvrsti in nadaljnje preskušanje ne bo potrebno.

Običajno se uporabi skupina petih živali istega spola za vsako preiskovano velikost odmerka. Med petimi živalmi je ena iz opazovalne študije, ki prejema odmerke izbrane velikosti skupaj s štirimi dodatnimi živalmi (razen, kar ni običajno, če velikost odmerka, uporabljenega v glavni študiji, ni bila vključena v opazovalni študiji).

Časovni interval med odmerjanjem vsake velikosti je točno opredeljen z nastopom, trajanjem in resnostjo toksičnih znakov. Tretiranje živali z naslednjim odmerkom je treba prestaviti na kasneje, dokler ni gotovo, da so živali, ki so predhodno dobile odmerek, preživele. Priporočeno je po potrebi obdobje 3 do 4 dni med odmerjanjem vsake velikosti odmerka za upoštevanje opazovanja zapoznele toksičnosti. Časovni interval se lahko ustrezno prilagodi, npr. v primeru brezuspešnega odziva.

▼B

Kadar se upošteva zgornji točno določeni odmerek 5 000 mg/kg, je treba izpeljati postopek, opisan v Dodatku 3 (glej tudi oddelek 1.6.2).

1.5.3.2 *Mejni preskus*

Mejni preskus se uporablja predvsem v primerih, kadar ima izvajalec preskusa informacije, ki kažejo, da bo preskusni material verjetno netoksičen oziroma bo njegova toksičnost le nad regulatornimi mejnimi odmerki. Informacije o toksičnosti preskusnega materiala se lahko pridobi na podlagi znanja o podobnih preskusnih spojinah ali podobnih preskusnih mešanicah ali produktih, ob upoštevanju vrste in odstotka sestavin, za katere je znano, da so toksikološko pomembne. V tistih primerih, kjer je le malo ali nič informacij o njegovi toksičnosti, ali kadar se pričakuje, da bo preskusni material toksičen, je treba opraviti glavni preskus.

Uporaba običajnega postopka, začetni odmerek opazovalne študije 2 000 mg/kg (ali izjemoma 5 000 mg/kg), čemur sledi odmerjanje za naslednje 4 živali s to velikostjo odmerka, se upošteva kot mejni preskus za to navodilo.

1.6 OPAZOVANJA

Živali se opazujejo posamezno po odmerjanju najmanj enkrat v prvih 30 minutah, periodično v prvih 24 urah, s posebno pozornostjo v prvih 4 urah in nato 14 dni vsak dan, razen kadar jih je treba odstraniti iz študije in humano usmrtiti, če je njihovo zdravje ogroženo ali ko so najdene poginule. Trajanja opazovanja ni treba strogo določiti. Opredeliti ga je treba na podlagi toksičnih reakcij, časa nastopa in trajanja obdobja okrevanja ter ga je zato mogoče podaljšati, kadar je to potrebno. Obdobja, ko se pojavijo znaki toksičnosti in ko izginejo, so pomembna, zlasti če obstaja možnost, da bodo toksični znaki zapozneli (11). Vsa opazovanja se sistematsko zabeležijo, za vsako žival se vodijo posamezne kartoteke.

Dodatna opazovanja bodo potrebna, če živali še vedno kažejo znake toksičnosti. Opazovanja morajo vključevati spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznicah, in tudi na dihalih, v obtoku, na avtonomnih in centralnih živčnih sistemih ter pri somatomotoričnih aktivnostih in vzorcu vedenja. Pozornost je treba posvetiti opazovanjem trezorjev, krčem, slinjenju, driski, otrplosti, spanju in komi. Treba je upoštevati principe in kriterije, povzete v Dokumentu s smernicami za humane končne točke (8). Živali, najdene v umirajočem stanju, in živali, ki kažejo hudo bolečino in trajne znake resne stiske, je treba humano usmrtiti. Kadar se živali usmrtijo iz humanih razlogov ali so najdene poginule, je treba čas smrti zabeležiti kar se da natančno.

1.6.1 **Telesna teža**

Posamezne teže živali je treba ugotoviti tik pred dajanjem preskusne snovi in najmanj enkrat na teden po tem. Treba je izračunati in zabeležiti spremembe teže. Na koncu preskusa se preživele živali stehtajo in nato humano usmrtijo.

▼B

1.6.2 **Patologija**

Za vse preskusne živali (vključno s tistimi, ki poginejo med preskušanjem ali se odstranijo iz študije zaradi ogroženega zdravja živali) je treba opraviti popolno obdukcijo. Vse natančne patološke spremembe je treba zabeležiti za vsako žival. Mikroskopski pregled organov živali, ki so preživele 24 ali več ur po začetnem odmerjanju, se prav tako lahko upošteva, ker lahko da koristne informacije.

2. **PODATKI**

Zagotoviti je treba podatke za vsako posamezno žival. Nadalje je treba vse podatke prikazati v obliki preglednice, kjer je za vsako preskusno skupino prikazano število uporabljenih živali, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, število živali, najdenih poginulih med preskusom ali usmrčenih iz humanih razlogov, čas smrti posameznih živali, opis in časovni potek toksičnih učinkov in reverzibilnost ter ugotovitve obdukcije.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije, kot je primerno:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje, čistost in, kjer je pomembno, fizikalno-kemijske lastnosti (vključno z izomernostjo),

— identifikacijske podatke, vključno s številko CAS.

Nosilec (če je primerno):

— utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev,

— mikrobiološko stanje živali, kadar je znano,

— število, starost in spol živali (vključno, kjer je primerno, utemeljitev uporabe samcev namesto samic),

— vir, pogoji vzdrževanja, vrsta hrane, itd.

Pogoji preskusa:

— podatki o formulaciji preskusne snovi, vključno s podatki o fizikalni obliki snovi, ki jo dajemo,

— podatki o formulaciji preskusne snovi, vključno z volumni odmerjanja in časom odmerjanja,

— podatki o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto hrane/vir, vir vode),

— utemeljitev za izbiro začetnega odmerka.

▼B

Rezultati:

— preglednica odzivnih podatkov in velikost odmerka za vsako žival (npr. živali, ki kažejo znake toksičnosti, vključno s smrtnostjo, vrsto, resnostjo in trajanjem učinkov),

— preglednica telesne teže in sprememb telesne teže,

— teže posameznih živali na dan odmerjanja in v tedenskih intervalih po tem ter čas smrti ali usmrtitve,

— datum in čas smrti, če nastopi pred načrtovano usmrtitvijo,

— časovni potek nastopa znakov toksičnosti in ali so bili reverzibilni za vsako žival,

— ugotovitve obdukcije in histopatološke ugotovitve za vsako žival, če so na voljo.

Razprava in razlaga rezultatov.

Zaključki.

4. **LITERATURA**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85–92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279–291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469–482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315–323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

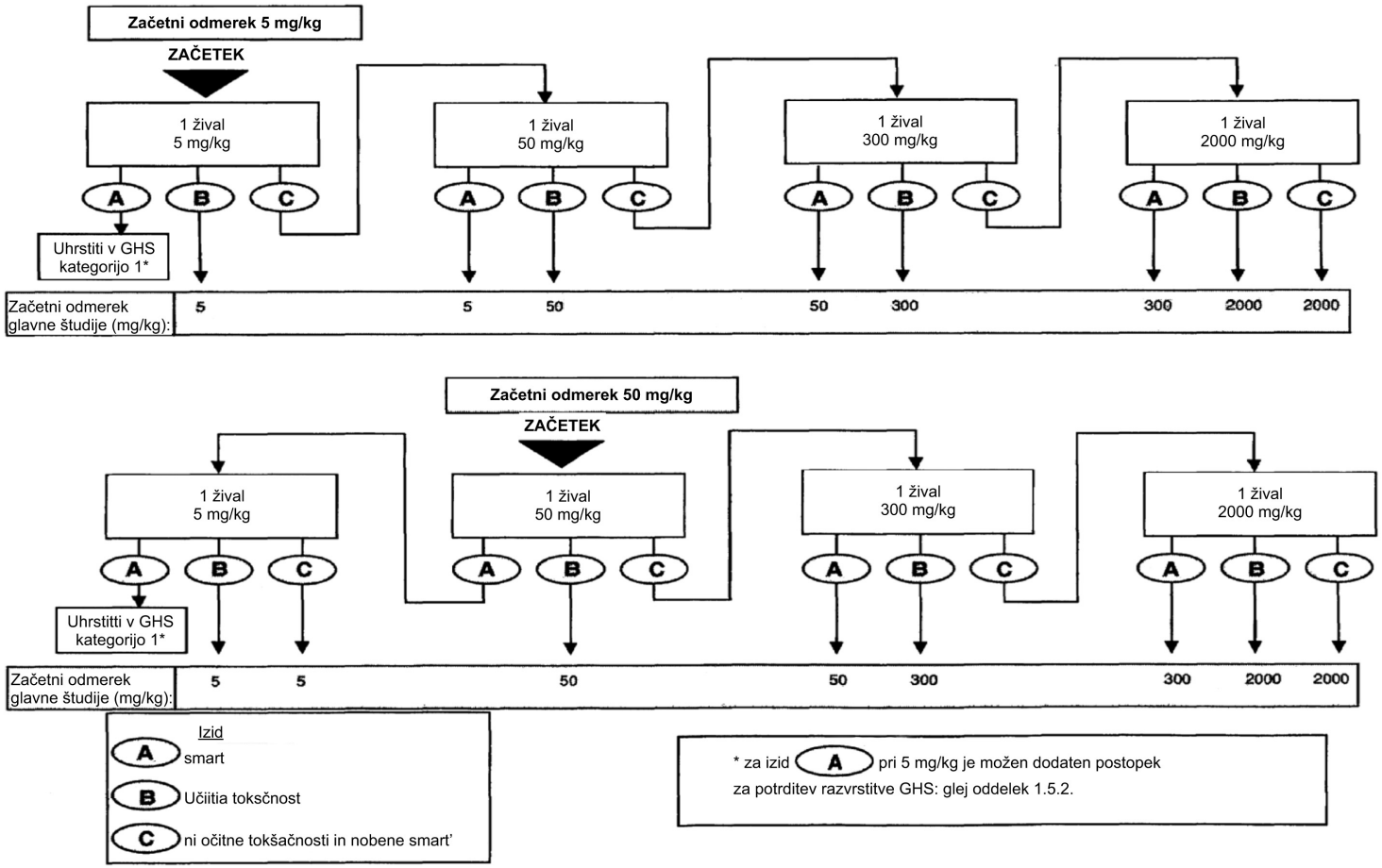
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

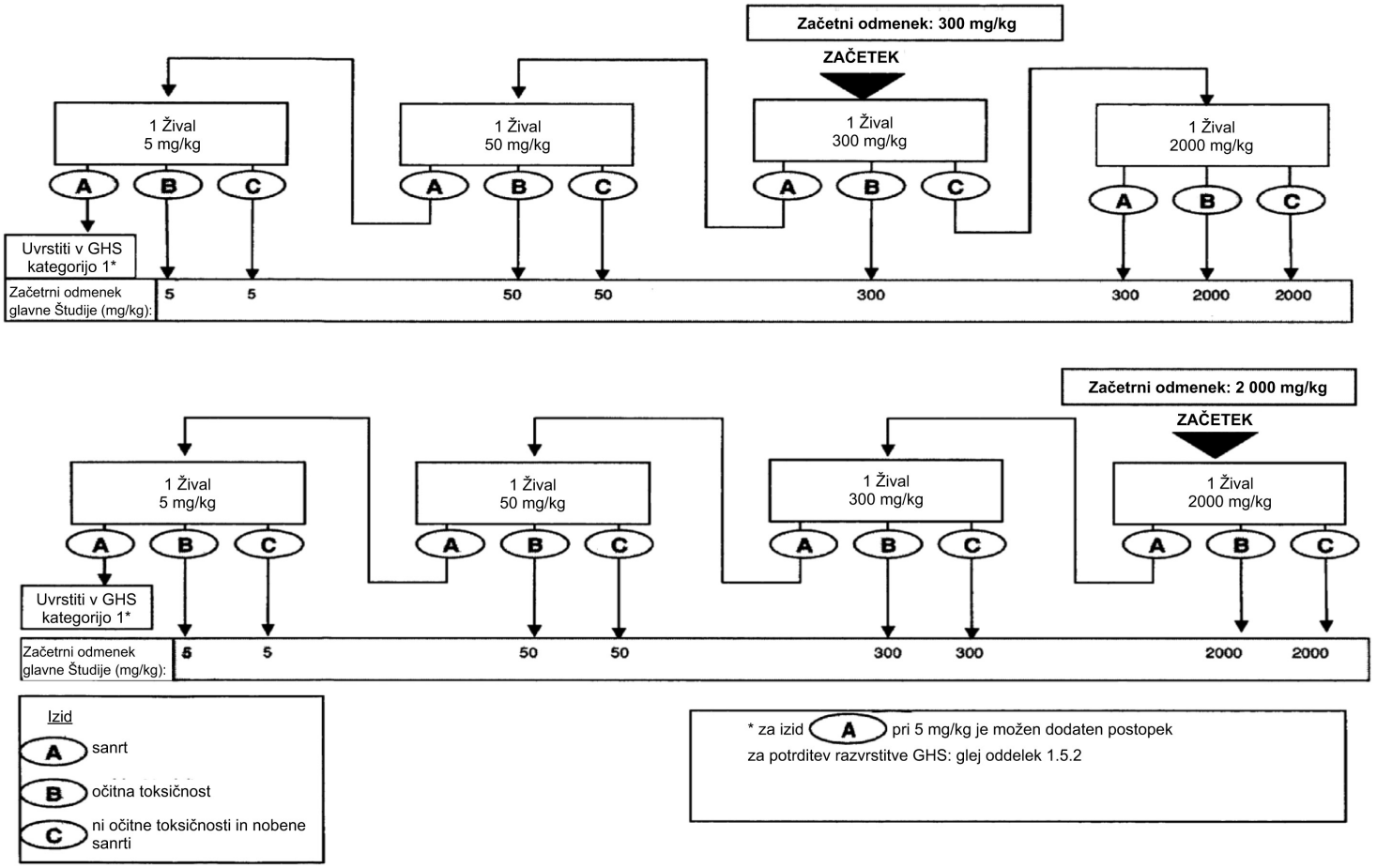
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J. A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223–231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . In: Principles and Methods of Toxicology . 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

DODATEK 1

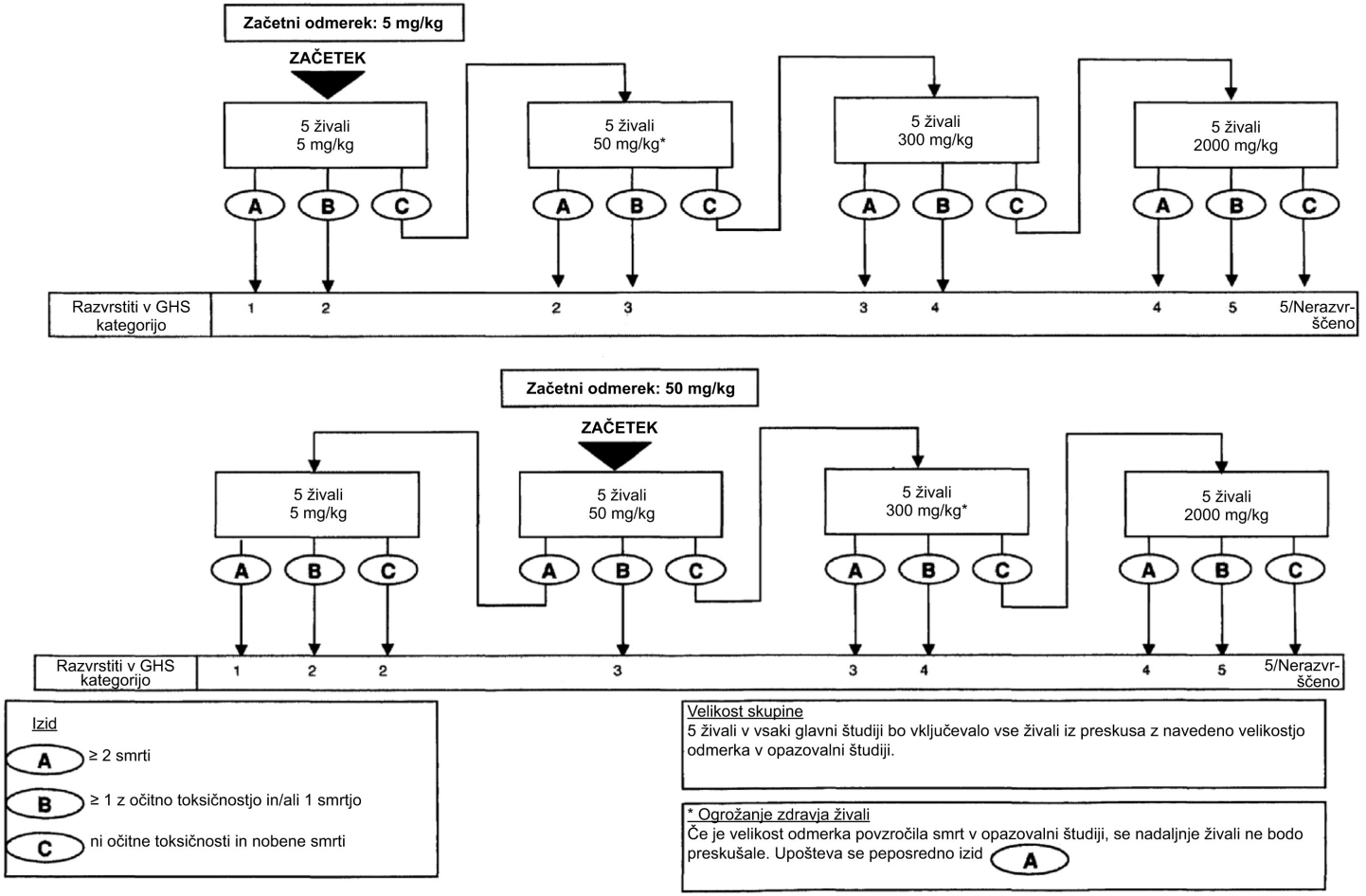
TABELA POTEKA ZA OPAZOVALNO ŠTUDIJO

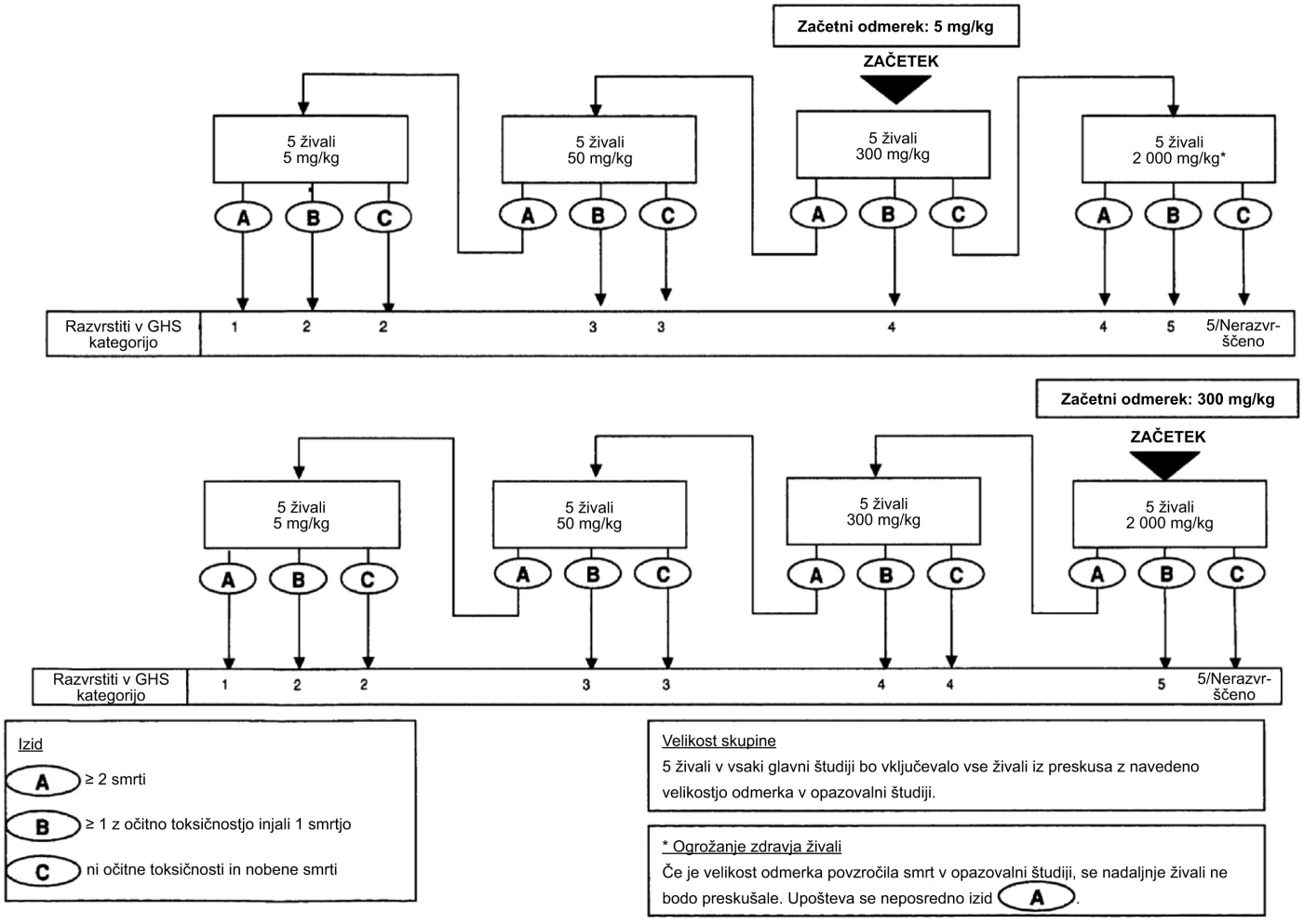



Začetni odmenek: 300 mg/kg
ZAČETEK
1 Žival
5 mg/kg
1 Žival
50 mg/kg
1 Žival
300 mg/kg
1 Žival
2000 mg/kg
A
B
C
Uvrstiti v GHS kategorijo 1*
Začetni odmenek glavne Študije (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Začetni odmenek: 2 000 mg/kg
ZAČETEK
1 Žival
5 mg/kg
1 Žival
50 mg/kg
1 Žival
300 mg/kg
1 Žival
2000 mg/kg
A
B
C
Uvrstiti v GHS kategorijo 1*
Začetni odmenek glavne Študije (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Izid
A sanrt
B očitna toksičnost
C ni očitne toksičnosti in nobene sanrti
* za izid A pri 5 mg/kg je možen dodaten postopek za potrditev razvrstitve GHS: glej oddelek 1.5.2

DODATEK 2

TABELA POTEKA ZA GLAVNO ŠTUDIJO




Začetni odmerek: 5 mg/kg
ZAČETEK
5 živali 5 mg/kg
5 živali 50 mg/kg
5 živali 300 mg/kg
5 živali 2 000 mg/kg*
A B C
Razvrstiti v GHS kategorijo
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Nerazvrščeno
Začetni odmerek: 300 mg/kg
ZAČETEK
5 živali 5 mg/kg
5 živali 50 mg/kg
5 živali 300 mg/kg
5 živali 2 000 mg/kg
A B C
Razvrstiti v GHS kategorijo
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Nerazvrščeno
Izid
A ≥ 2 smrti
B ≥ 1 z očitno toksičnostjo injali 1 smrtjo
C ni očitne toksičnosti in nobene smrti
Velikost skupine
5 živali v vsaki glavni študiji bo vključevalo vse živali iz preskusa z navedeno velikostjo odmerka v opazovalni študiji.
* Ogrožanje zdravja živali
Če je velikost odmerka povzročila smrt v opazovalni študiji, se nadaljnje živali ne bodo preskušale. Upošteva se neposredno izid A.

▼B

Dodatek 3

KRITERIJI ZA RAZVRSTITEV PRESKUSNIH SNOVI S PRIČAKOVANIMI VREDNOSTMI LD_{50}, KI NE PRESEGAJO 2 000 mg/kg IN JIH NI POTREBNO PRESKUSITI

Kriteriji za kategorijo 5 nevarnih snovi so namenjeni omogočanju identifikacije preskusnih snovi, katerih nevarnost akutne toksičnosti je sorazmerno nizka, vendar lahko v nekaterih okoliščinah pomenijo nevarnost za ranljivo populacijo. Za te snovi se predvideva, da imajo oralni ali kožni LD_{50} v območju 2 000-5 000 mg/kg ali enakovrednih odmerkov za druge poti vnosa. Preskusne snovi bi se lahko uvrstile v kategorijo nevarnih snovi, opredeljeno z: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategorijo 5 v GHS) v naslednjih primerih:

(a) če so uvrščene v to kategorijo po kateri koli shemi preskušanja Dodatka 2, na podlagi pogostnosti smrti;

(b) če so že na voljo dokazi, ki kažejo na to, da je LD_{50} v območju vrednosti kategorije 5; ali če druge študije na živalih ali študije toksičnih učinkov na ljudi kažejo na zaskrbljenost zaradi akutnosti za zdravje ljudi;

(c) z ekstrapolacijo, oceno ali meritvijo podatkov, če uvrstitev v višjo skupino nevarnih snovi ni zajamčena, in

— so na voljo zanesljive informacije, ki kažejo na toksične učinke na ljudeh, ali

— se opazi kakršna koli smrtnost pri preskušanju do vrednosti kategorije 4 po oralni poti, ali

— kadar strokovna presoja potrdi pomembne klinične znake toksičnosti pri preskušanju do vrednosti kategorije 4, z izjemo driske, piloerekcije ali nenormalnega videza, ali

— kadar se s strokovno presojo potrdi zanesljive informacije, ki kažejo na možnost pomembnih akutnih učinkov iz drugih študij na živalih.

PRESKUŠANJE Z ODMERKI NAD 2 000 mg/kg

Izjemoma, in le, kadar to opravičujejo posebne regulatorne zahteve, se lahko upošteva uporaba dodatne večje velikosti točno določenega odmerka 5 000 mg/kg. Zaradi skrbi za zaščito zdravja živali je preskušanje živali s 5 000 mg/kg nezaželeno in bi ga morali upoštevati le, kadar obstaja velika verjetnost, da bi rezultati takšnega preskusa imeli neposreden pomen za zaščito zdravja živali ali ljudi (9).

Opazovalna študija

Pravila o odločitvah, ki veljajo za zaporedni postopek, predstavljena v Dodatku 1, se razširijo za vključitev velikosti odmerka 5 000 mg/kg. Kadar se bo uporabil začetni odmerek opazovalne študije 5 000 mg/kg, bo zato izid A (smrt) zahteval še preskušanje druge živali pri 2 000 mg/kg; izida B in C (očitna toksičnost in nobene toksičnosti) bosta dopuščala izbiro 5 000 mg/kg kot začetnega odmerka za glavno študijo. Če se bo uporabil začetni odmerek, ki bo različen od 5 000 mg/kg, tedaj se bo preskušanje nadaljevalo do 5 000 mg/kg v primeru izidov B ali C pri 2 000 mg/kg; naslednji izid A pri 5 000 mg/kg bo narekoval začetni odmerek za glavno študijo 2 000 mg/kg in izida B in C bosta narekovala začetni odmerek za glavno študijo 5 000 mg/kg.

▼B

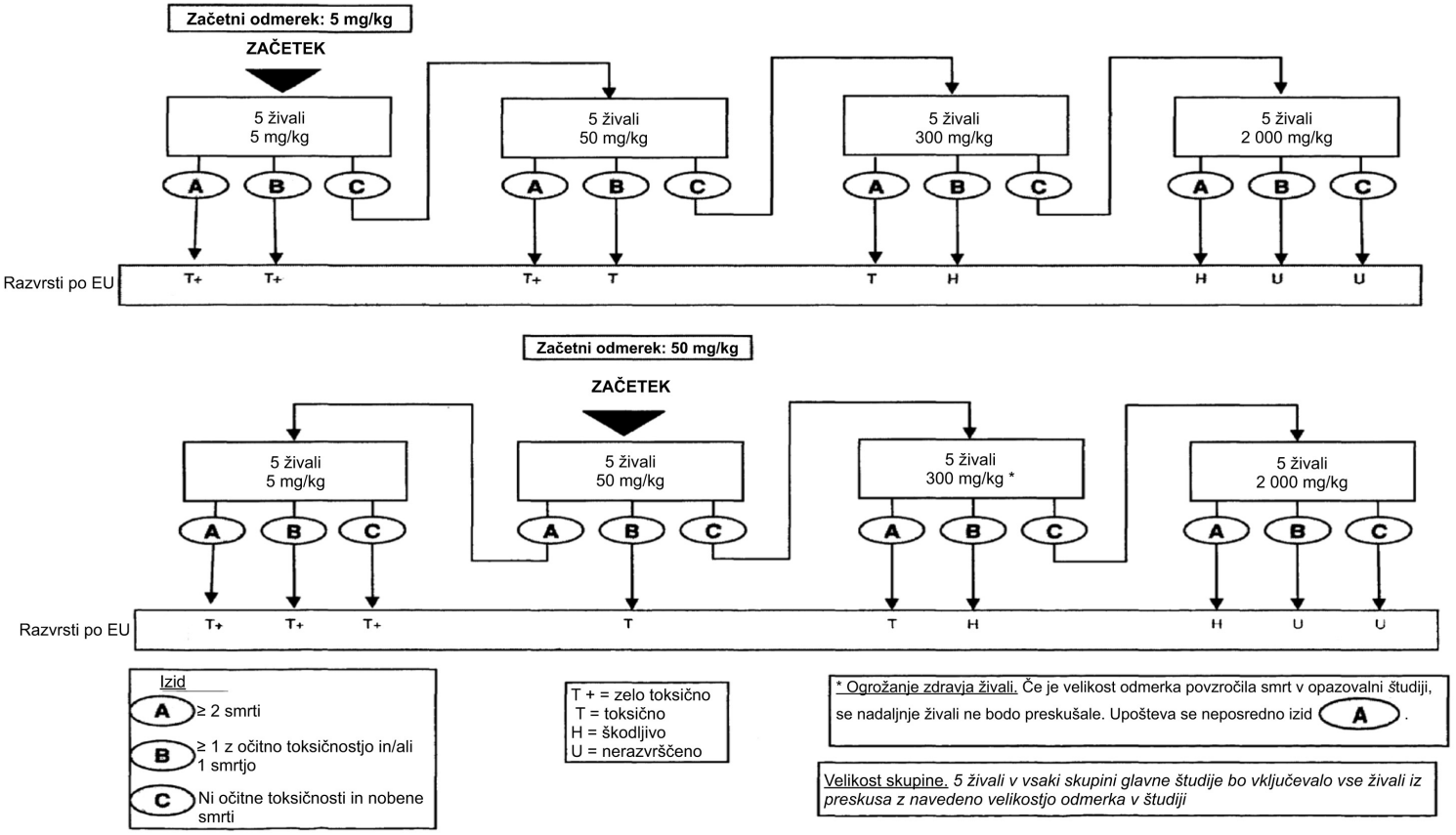
Glavna študija

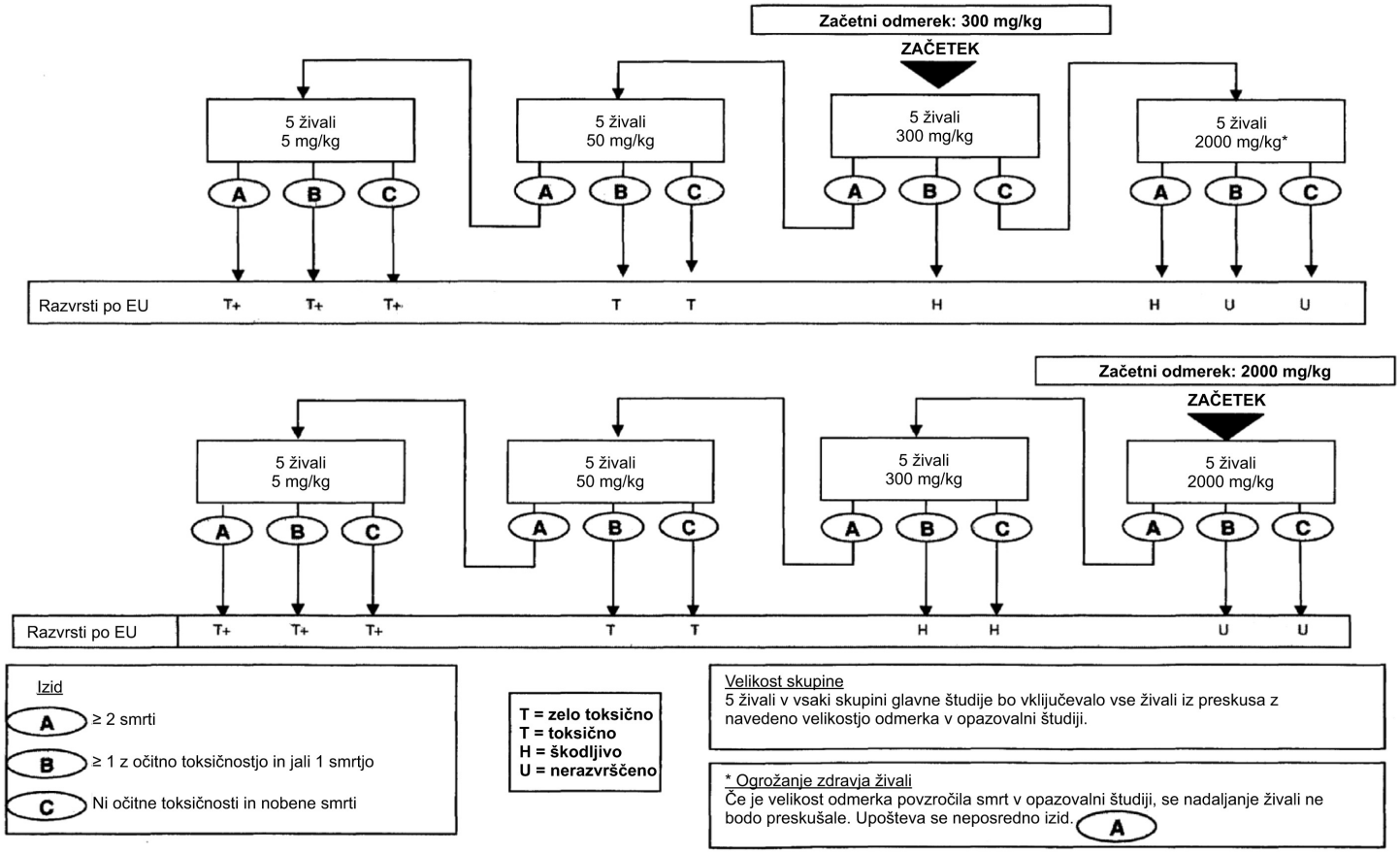
Pravila o odločitvah, ki veljajo za zaporedni postopek, predstavljena v Dodatku 2, se razširijo na vključitev velikosti odmerka 5 000 mg/kg. Kadar se bo uporabil začetni odmerek glavne študije 5 000 mg/kg, bo zato izid A (> 2 smrt) zahteval še preskušanje druge skupine pri 2 000 mg/kg; iz izida B (očitna toksičnost in/ali ≤ 1 smrt) ali C (nobene toksičnosti) bo sledila neuvrščenost snovi v skladu z GHS. Podobno se bo, če bo odmerek različen od 5 000 mg/kg, preskušanje nadaljevalo do 5 000 mg/kg v primeru izida C pri 2 000 mg/kg, iz zaporednega izida A pri 5 000 mg/kg bo sledila uvrstitev snovi v kategorijo GHS 5, iz izidov B in C pa sledi, da bo snov neuvrščena.

DODATEK 4

PRESKUSNA METODA B.l bis

Napotki za razvrstitev v skladu s shemo EU za obdobje tranzicije do popolne uveljavitve Globalno usklajenega sistema razvrstitve (GHS) (iz sklica (8))




Začetni odmerek: 300 mg/kg
ZAČETEK
5 živali
5 mg/kg
5 živali
50 mg/kg
5 živali
300 mg/kg
5 živali
2000 mg/kg*
A B C
Razvrsti po EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Začetni odmerek: 2000 mg/kg
ZAČETEK
5 živali
5 mg/kg
5 živali
50 mg/kg
5 živali
300 mg/kg
5 živali
2000 mg/kg
A B C
Razvrsti po EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Izid
A ≥ 2 smrti
B ≥ 1 z očitno toksičnostjo in jali 1 smrtjo
C Ni očitne toksičnosti in nobene smrti
T = zelo toksično
T = toksično
H = škodljivo
U = nerazvrščeno
Velikost skupine
5 živali v vsaki skupini glavne študije bo vključevalo vse živali iz preskusa z navedeno velikostjo odmerka v opazovalni študiji.
* Ogrožanje zdravja živali
Če je velikost odmerka povzročila smrt v opazovalni študiji, se nadaljanje živali ne bodo preskušale. Upošteva se neposredno izid. A

▼B

B.1 tris. **AKUTNA ORALNA TOKSIČNOST – METODA RAZREDOV AKUTNE TOKSIČNOSTI**

1. **METODA**

Ta preskusna metoda ustreza OECD TG 423 (2001)

1.1 UVOD

Metoda razredov akutne toksičnosti (1), prikazana v tem preskusu, je postopen postopek z uporabo treh živali enega spola za vsak korak. Odvisno od smrtnosti in/ali umirajočega stanja živali so lahko potrebni 2–4 koraki za omogočanje presoje o akutni toksičnosti preskusne snovi. Ta postopek je ponovljiv, zanj se uporablja zelo malo živali in omogoča razvrstitev snovi na podoben način kot z drugimi metodami preskušanja akutne toksičnosti. Metoda razredov akutne toksičnosti temelji na biometričnih vrednotenjih (2) (3) (4) (5) s točno določenimi odmerki, primerno ločenimi med seboj, da se omogoči uvrščanje snovi za razvrstitev in za ugotavljanje nevarnosti. Metoda, kakor je bila prejeta leta 1996, je bila obširno validirana *in vivo* v primerjavi s podatki za LD_{50}, dobljenimi iz literature, tako nacionalne (6) kakor tudi mednarodne (7).

Navodila za izbiro najustreznejše preskusne metode za dani namen se lahko poiščejo v Dokumentu s smernicami za preskušanje akutne oralne toksičnosti (8). Ta dokument s smernicami vsebuje tudi dodatne informacije o postopku in razlagi metode preskušanja B.1 tris.

Preskusnih snovi, v odmerkih, za katere je znano, da povzročajo vidno bolečino in hude motnje pri živalih zaradi jedkega ali izrazito dražilnega delovanja, ni treba dajati. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo ali kažejo znake hudih in trajnih okvar, se usmrti na human način in se jih upošteva pri razlagi rezultatov preskusa na enak način, kot živali, ki so poginile med preskusom. Kriterije za sprejem odločitve o usmrtitvi umirajočih živali ali živali, ki zelo trpijo, ter napotke za prepoznavanje napovedljive ali neizbežne smrti obravnava poseben Dokument s smernicami (9).

Metoda uporablja predhodno določene odmerke, rezultati pa omogočajo razvrstitev snovi in uvrstitev v skladu z Globalno usklajenim sistemom za razvrščanje kemikalij, ki povzročajo akutno toksičnost (10).

V principu metoda ni namenjena omogočanju izračuna točnega LD_{50}, vendar upošteva določitev opredeljenih razponov izpostavitve, kjer se pričakuje smrtnost, ker je smrt dela živali še vedno glavna končna točka tega preskusa. Ta metoda upošteva določitev vrednosti LD_{50} le, kadar iz najmanj 2 odmerkov sledi smrtnost, višja kakor 0 % in nižja kakor 100 %. Uporaba izbire predhodno določenih odmerkov, ne glede na preskusno snov, z razvrstitvijo, ki je izrecno povezana s številom živali, opazovanih v različnih stanjih, izboljšuje možnost za doslednost in ponovljivost poročanja med laboratoriji.

▼B

Laboratorij preskušanja mora upoštevati vse razpoložljive informacije o preskusni snovi pred začetkom opravljanja študije. Takšne informacije bodo vključevale vrsto in kemijsko sestavo snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultat katerih koli drugih preskusov toksičnosti na snovi, *in vitro* ali *in vivo*; toksikološke podatke o strukturno sorodnih ter pričakovano uporabo/uporabe snovi. Te informacije so potrebne, da vse, ki jih to zadeva, zagotovijo, da je preskus pomemben za zaščito zdravja ljudi in da bo v pomoč pri izbiri najustreznejšega začetnega odmerka.

1.2 DEFINICIJE

Akutna oralna toksičnost: nanaša se na tiste škodljive učinke, ki se pokažejo po dajanju enega odmerka snovi ali več odmerkov, danih v 24 urah.

Kasnejša smrt: pomeni, da žival ne pogine ali da ne kaže znakov, da bo poginila, v 48 urah, vendar pogine kasneje med 14 dnevnim obdobjem opazovanja.

Odmerek: je količina dane preskusne snovi. Odmerek je izražen kot masa preskusne snovi na enoto teže preskusne živali (npr. mg/kg).

GHS: Sistem globalno usklajene razvrstitve za kemijske snovi in mešanice. Skupna aktivnost OECD (zdravje ljudi in okolje), Odbor ZN strokovnjakov za prevoz nevarnega blaga (fizikalno-kemijske lastnosti) in ILO (sporočanje o nevarnosti) ter koordinirana med organizacijami s programom za pravilno ravnanje s kemikalijami (IOMC).

Neizbežna smrt: ko se pričakuje umirajoče stanje ali smrt pred naslednjim planiranim časom opazovanja. Značilni znaki tega stanja pri glodalcih lahko vključujejo krče, bočni položaj, poležavanje in tremor. (Glej Dokument s smernicami z napotki za humane mejne cilje (9) za več podrobnih podatkov).

LD_{50} (srednji smrtni odmerek): je statistično ugotovljen enkraten odmerek snovi, za katerega se lahko pričakuje, da bo povzročil smrt pri 50 odstotkih živali, kadar se jim da oralno. Vrednost LD_{50} je izražena z maso preskusne snovi na enoto teže preskusne živali (mg/kg).

Mejni odmerek: nanaša se na odmerek na zgornji omejitvi pri preskušanju (2 000 ali 5 000 mg/kg).

Umirajoče stanje: stanje umiranja ali nezmožnosti preživeti kljub tretiranju. (Glej Dokument s smernicami humane končne točke (9) za več podrobnih podatkov).

Pričakovana smrt: prisotnost kliničnih znakov, ki kažejo na smrt ob znanem času v prihodnosti pred načrtovanim zaključkom eksperimenta, na primer: nezmožnost živali, da bi dosegle vodo ali hrano. (Glej Priročnik napotki za humane končne točke (9) za več podrobnih podatkov).

▼B

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Princip preskusa je tak, da temelji na postopnosti z uporabo minimalnega števila živali za vsak korak, za omogočanje uvrstitve se pridobi dovolj informacij o akutni toksičnosti preskusne snovi. Snov se daje oralno skupini eksperimentalnih v enem od predhodno opredeljenih odmerkov. Snov se testira z uporabo postopka po korakih, za vsak korak se uporabi tri živali istega spola, običajno ženskega. Prisotnost ali odsotnost smrtnosti živali, povezane s spojino, ki so prejemale odmerek na enem koraku, bo določila naslednji korak, npr.:

— nadaljnje preskušanje ni potrebno,

— odmerjanje za tri dodatne živali, z enakim odmerkom,

— odmerjanje za tri dodatne živali, z naslednjo večjo ali naslednjo manjšo velikostjo odmerka.

Podrobnosti preskusnega postopka so opisane v Dodatku 1. Metoda bo omogočila presojo glede uvrstitve preskusne snovi v enega v seriji razredov toksičnosti, opredeljenih s točno določenimi smrtnimi vrednostmi LD_{50}.

1.4 OPIS METODE

1.4.1 **Izbira živalskih vrst**

Najbolj cenjena vrsta glodalca je podgana, čeprav se lahko uporabijo tudi druge vrste glodalcev. Običajno se uporabljajo samice (9), to pa zato, ker pregledi običajnih LD_{50} preskusov v literaturi kažejo, da je le malo razlik v občutljivosti med spoloma, vendar so v tistih primerih, kjer se opažajo razlike, samice v splošnem neznatno bolj občutljive (11). Če pa iz poznavanja toksikoloških in toksikokinetičnih lastnosti strukturno sorodnih kemikalij izhaja, da je verjetno, da bodo samci bolj občutljivi, tedaj je treba uporabiti ta spol. Kadar poteka preskušanje na samcih, je treba imeti za to ustrezno obrazložitev.

Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Samice morajo biti nuliparne in ne smejo biti breje. Živali morajo biti na začetku odmerjanja stare 8 do 12 tednov, njihova teža pa se mora gibati v intervalu ± 20 % povprečne teže katerih koli živali, ki so predhodno prejemale odmerek.

1.4.2 **Pogoji bivanja in hranjenja**

Temperatura prostora za preskuse z živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, razen med čiščenjem prostora, 50 do 60 %. Osvetlitev mora biti umetna v zaporedju 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporabijo običajne predpisane laboratorijska vrste hranjenja z neomejeno količino pitne vode. Živali se lahko razporedijo v kletke po skupinah glede na odmerek, vendar število živali v vsaki kletki ne sme vplivati na neovirano opazovanje vsake živali.

▼B

1.4.3 **Priprava živali**

Živali se izberejo naključno, označijo se zato, da je možna individualna identifikacija in se zaprejo v kletke najmanj 5 dni pred začetkom odmerjanja, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram.

1.4.4 **Priprava odmerkov**

Na splošno je treba preskusne snovi dajati v konstantnem volumnu v razponu odmerkov, ki jih je treba preskusiti s spreminjanjem koncentracije pripravka odmerjanja. Kadar se namerava preskusiti tekoč končni produkt ali mešanico, je uporaba nerazredčene preskusne snovi, npr. pri konstantni koncentraciji, morda ustreznejša za naknadno oceno tveganja navedene snovi, in jo nekateri regulatorni organi zahtevajo. Maksimalni volumen odmerka se v nobenem primeru ne sme prekoračiti. Maksimalni volumen tekočine, ki se jo lahko da živali naenkrat, je odvisen od velikosti preskusne živali. Pri glodalcih volumen običajno ne sme presegati 1 ml/100g telesne teže, pri vodnih raztopinah pa lahko upoštevamo 2 ml/100 g telesne teže. Glede na formulacijo preparata odmerjanja je priporočena uporaba vodne raztopine/suspenzije/emulzije, kjer koli je to možno, sledi po preferenčnem vrstnem redu raztopina/suspenzija/emulzija v olju (npr. koruzno olje) in nato po možnosti raztopina v drugih nosilcih. Za nosilce, ki niso voda, je treba poznati toksikološke lastnosti nosilca. Odmerke je treba pripraviti tik pred dajanjem, razen kadar je znana stabilnost pripravka za obdobje, v katerem bo uporabljen, in je znano, da je sprejemljiva.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 **Dajanje odmerkov**

Preskusna snov se daje v enem odmerku z gavažo z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. V neobičajnih razmerah, ko enojni odmerek ni mogoč, lahko odmerek dajemo v manjših frakcijah v obdobju, ki ne presega 24 ur.

Živali se morajo pred odmerjanjem postiti (npr. podgani je treba odtegniti hrano čez noč, vode pa ne; miš ne sme dobiti hrane 3 do 4 ure prej, vodo pa lahko). Po obdobju postenja je treba živali stehtati in jim dati preskusno snov. Po dajanju preskusne snovi se lahko odtegne hrano podganam za nadaljnje 3–4 ure ali mišim za 1–2 uri. Kadar se odmerek daje v frakcijah ves čas, je možno, da bo potrebno oskrbovati živali s hrano in vodo, odvisno od trajanja časovnega obdobja.

1.5.2 **Število živali in velikost odmerkov**

Za vsak korak so potrebne 3 živali. Velikost odmerka, ki ga bo treba uporabiti kot začetni odmerek, se izbere izmed štirih stalnih velikosti, 5, 50, 300 in 2 000 mg/kg telesne teže. Začetna velikost odmerka bi morala biti tista, ki bo najverjetneje povzročila smrtnost nekaterih živali odmerjanja. Tabele poteka v Dodatku 1 opisujejo postopek, ki ga je treba izvesti za vsakega od začetnih odmerkov. Dodatek 4 daje poleg tega navodila za uvrstitev v sistem EU, dokler se ne bo izvajal novi GHS sistem.

▼B

Kadar je iz razpoložljivih informacije razvidno, da smrtnost pri največji velikosti (2 000 mg/kg telesne teže) ni verjetna, je treba opraviti mejni preskus. Kadar o snovi, ki jo je treba preskusiti, ni nobenih informacij, je priporočeno zaradi zdravja živali uporabiti začetni odmerek 30 mg/kg telesne teže.

Časovni interval med skupinami tretiranja je točno določen z nastopom, trajanjem in resnostjo toksičnih znakov. Tretiranje živali z naslednjim odmerkom je treba prestaviti na kasnejši čas, dokler ni gotovo, da bodo živali, ki so prej prejemale odmerek, preživele.

Izjemoma, in le kadar to opravičujejo posebne regulatorne zahteve, se lahko upošteva uporaba dodatne večje velikosti odmerka 5 000 mg/kg telesne teže (glej Dodatek 2). Zaradi skrbi za zaščito zdravja živali je preskušanje živali v območjih kategorije GHS 5 (2 000–5 000 mg/kg) nezaželeno in ga je treba upoštevati le, kadar obstaja velika verjetnost, da bi rezultati takšnega preskusa imeli neposreden pomen za zaščito zdravja ljudi ali živali ali za okolje.

1.5.3 **Mejni preskus**

Mejni preskus se uporablja predvsem v primerih, kadar ima izvajalec preskusa informacije, ki kažejo, da bo preskusni material verjetno netoksičen oziroma bo njegova toksičnost le nad regulatornimi mejnimi odmerki. Informacije o toksičnosti preskusnega materiala se lahko pridobijo na podlagi znanja o podobnih preskusnih spojinah ali podobnih preskusnih mešanicah ali produktih, ob upoštevanju vrste in odstotka sestavin, za katere je znano, da so toksikološko pomembne. V tistih primerih, kjer je le malo ali nič informacij o njegovi toksičnosti, ali kadar se pričakuje, da bo preskusni material toksičen, je treba opraviti glavni preskus.

Mejni preskus z eno velikostjo odmerka 2 000 mg/kg telesne teže se lahko opravi s šestimi živalmi (tri živali na en korak). Izjemoma se lahko opravi mejni preskus z eno velikostjo odmerka 5 000 mg/kg s tremi živalmi (glej Dodatek 2). Če nastane smrtnost, povezana s preskusno snovjo, bo morda potrebno izvesti nadaljnje preskušanje z naslednjo nižjo velikostjo.

1.6 OPAZOVANJA

Živali se opazujejo posamezno po odmerjanju najmanj enkrat v prvih 30 minutah, periodično v prvih 24 urah, s posebno pozornostjo v prvih 4 urah in nato 14 dni vsak dan, razen kadar jih je treba odstraniti iz študije in humano usmrtiti zaradi ogroženega zdravja ali ko so najdene poginule. Trajanja opazovanja ni treba strogo določiti. Opredeliti ga je treba na podlagi toksičnih reakcij, časa nastopa in trajanja okrevanja ter ga je zato mogoče podaljšati, kadar je to potrebno. Obdobja, ko se pojavijo znaki toksičnosti in ko izginejo, so pomembna, zlasti če obstaja težnja, da bodo toksični znaki zapozneli (12). Vsa opazovanja se sistematsko zabeležijo, za vsako žival se vodijo posamezne kartoteke.

▼B

Dodatna opazovanja bodo potrebna, če živali še vedno kažejo znake toksičnosti. Opazovanja morajo vključevati spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznicah, in tudi na dihalih, v obtoku, na avtonomnih in centralnih živčnih sistemih ter somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. Pozornost je treba posvetiti opazovanjem tremorjev, krčem, slinjenju, driski, otrplosti, spanju in komi. Treba je upoštevati principe in kriterije, povzete v Dokumentu s smernicami z napotki za humane končne točke (9). Živali, najdene v umirajočem stanju, in živali, ki kažejo hudo bolečino in trajne znake hudih okvar, je treba humano usmrtiti. Kadar živali usmrtimo zaradi humanih razlogov ali so najdene poginule, je treba čas smrti zabeležiti kar se da natančno.

1.6.1 **Telesna teža**

Posamezne teže živali je treba določiti tik pred dajanjem preskusne snovi in najmanj enkrat na teden po tem. Treba je izračunati in zabeležiti spremembe teže. Na koncu preskusa se preživele živali stehtajo in humano usmrtijo.

1.6.2 **Patologija**

Za vse preskusne živali (vključno s tistimi, ki poginejo med preskusom ali se odstranijo iz študije zaradi zaščite zdravja živali) je treba opraviti popolno obdukcijo. Vse natančne patološke spremembe je treba zabeležiti za vsako žival. Mikroskopski pregled organov, ki kažejo resne patološke znake, pri živalih, ki so preživele 24 ali več ur po začetnem odmerjanju se prav tako lahko upošteva, ker lahko da koristne informacije.

2. **PODATKI**

Zagotoviti je treba podatke za vsako posamezno žival. Nadalje je treba vse podatke prikazati v obliki preglednice, kjer je za vsako preskusno skupino prikazano število uporabljenih živali, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, število živali, najdenih poginulih med preskusom ali usmrčenih iz humanih razlogov, čas smrti posameznih živali, opis in časovni potek toksičnih učinkov in reverzibilnosti ter ugotovitve obdukcije.

3. **POROČANJE**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije, kot je primerno:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje, čistost in kjer je pomembno fizikalno-kemijske lastnosti (vključno z izomerizacijo),

— identifikacijski podatki, vključno s številko CAS.

Nosilec (če je primerno):

— utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev,

▼B

— mikrobiološko stanje živali, kadar je znano,

— število, starost in spol živali (vključno, kjer je primerno, utemeljitev za uporabo samcev namesto samic),

— vir, pogoji vzdrževanja, vrsta hrane, itd.

Pogoji preskusa:

— podatki o formulaciji preskusne snovi, vključno s podatki o fizikalni obliki snovi, ki se daje,

— podatki o dajanju preskusne snovi, vključno z volumni odmerjanja in časom odmerjanja,

— podatki o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto prehranjevanja/vir, vir vode),

— utemeljitev za izbiro začetnega odmerka.

Rezultati:

— tabelarni prikaz odzivnih podatkov in velikost odmerka za vsako žival (npr. živali, ki kažejo znake toksičnosti, vključno s smrtnostjo; vrsto, resnost in trajanje učinkov),

— tabelarni prikaz telesne teže in sprememb telesne teže,

— teže posameznih živali na dan odmerjanja in v tedenskih intervalih po tem ter čas smrti ali usmrtitve,

— datum in čas smrti, če nastopi pred načrtovano usmrtitvijo,

— časovni potek nastopa znakov toksičnosti in ali so bili le–ti reverzibilni za vsako žival,

— ugotovitve obdukcije in histopatološke ugotovitve za vsako žival, če so na voljo.

Razprava in razlaga rezultatov.

Zaključki.

4. **LITERATURA**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129–134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223–231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Dodatek 1

POSTOPKI, PO KATERIH SE JE TREBA RAVNATI ZA VSAKEGA OD ZAČETNIH ODMERKOV

SPLOŠNE PRIPOMBE

Za vsak začetni odmerek prikazujejo ustrezne sheme preskušanja, kakor jih vključuje ta dodatek, po katerem se je treba ravnati.

— Dodatek 1 a: Začetni odmerek 5 mg/kg telesne teže

— Dodatek 1 b: Začetni odmerek 50 mg/kg telesne teže

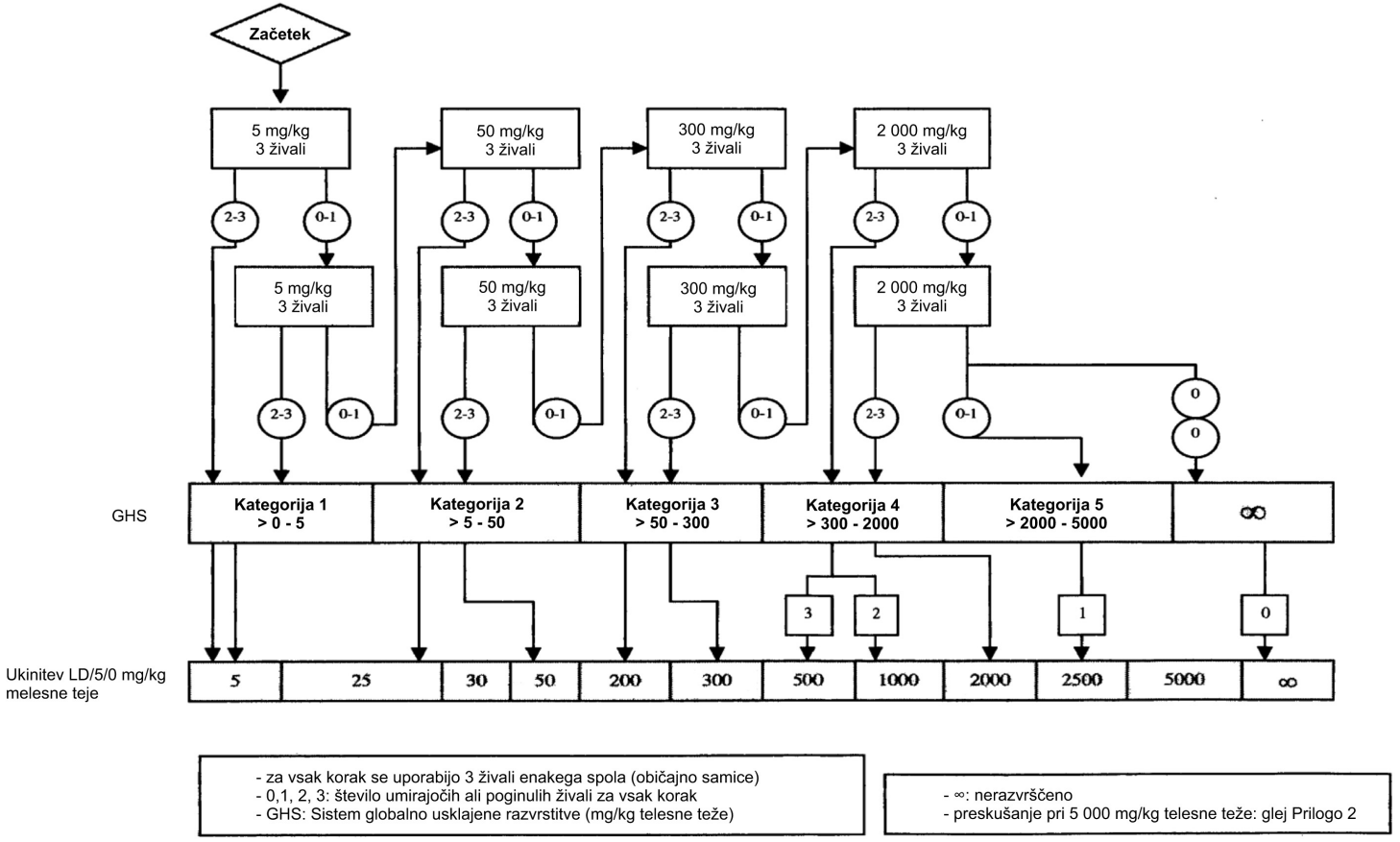
— Dodatek 1 c: Začetni odmerek 300 mg/kg telesne teže

— Dodatek 1 d: Začetni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže

Odvisno od števila humano usmrčenih živali ali poginulih živali sledi preskusni postopek navedenim puščicam.

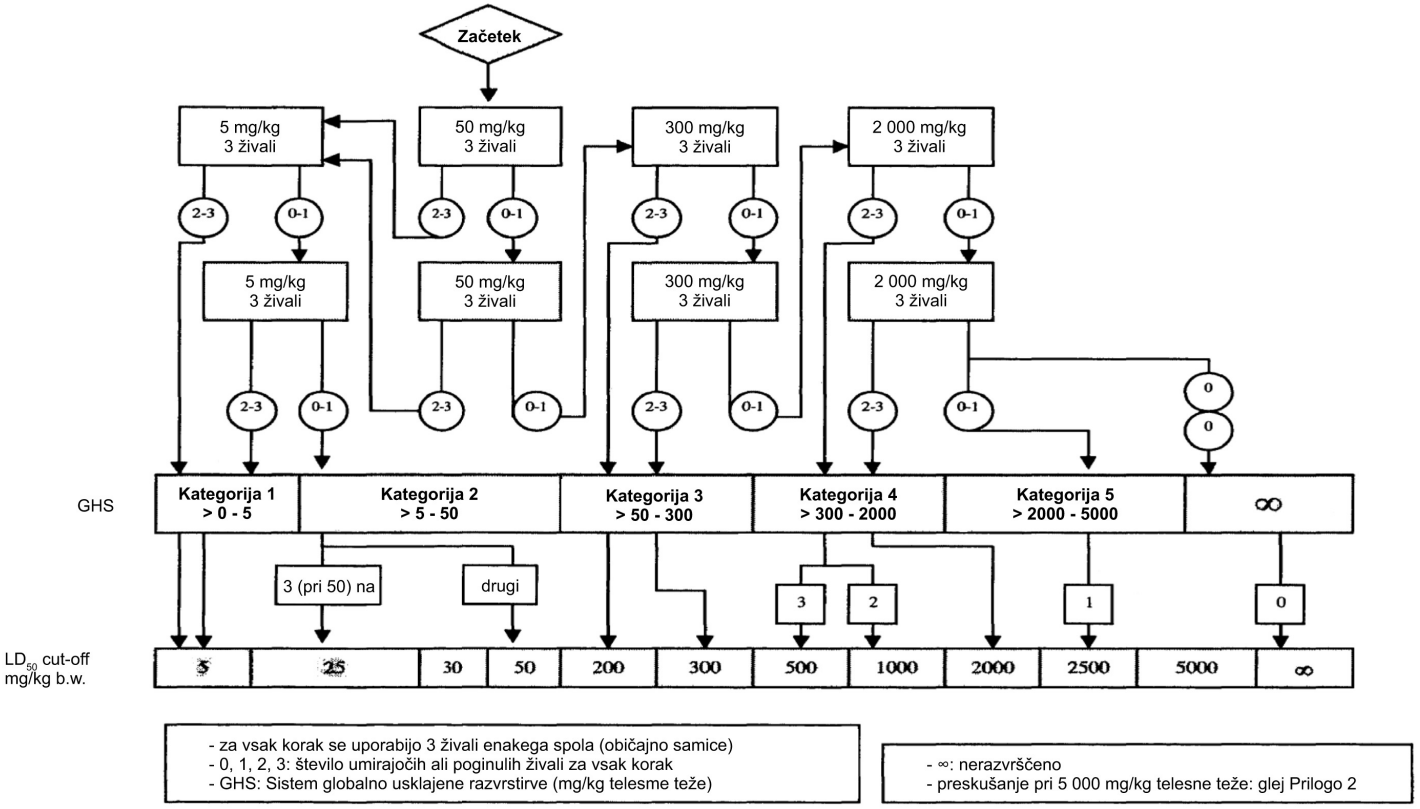
Dodatek 1 A

POSTOPEK PRESKUSA Z ZAČETNIM ODMERKOM 5 MG/KG TELESNE TEŽE



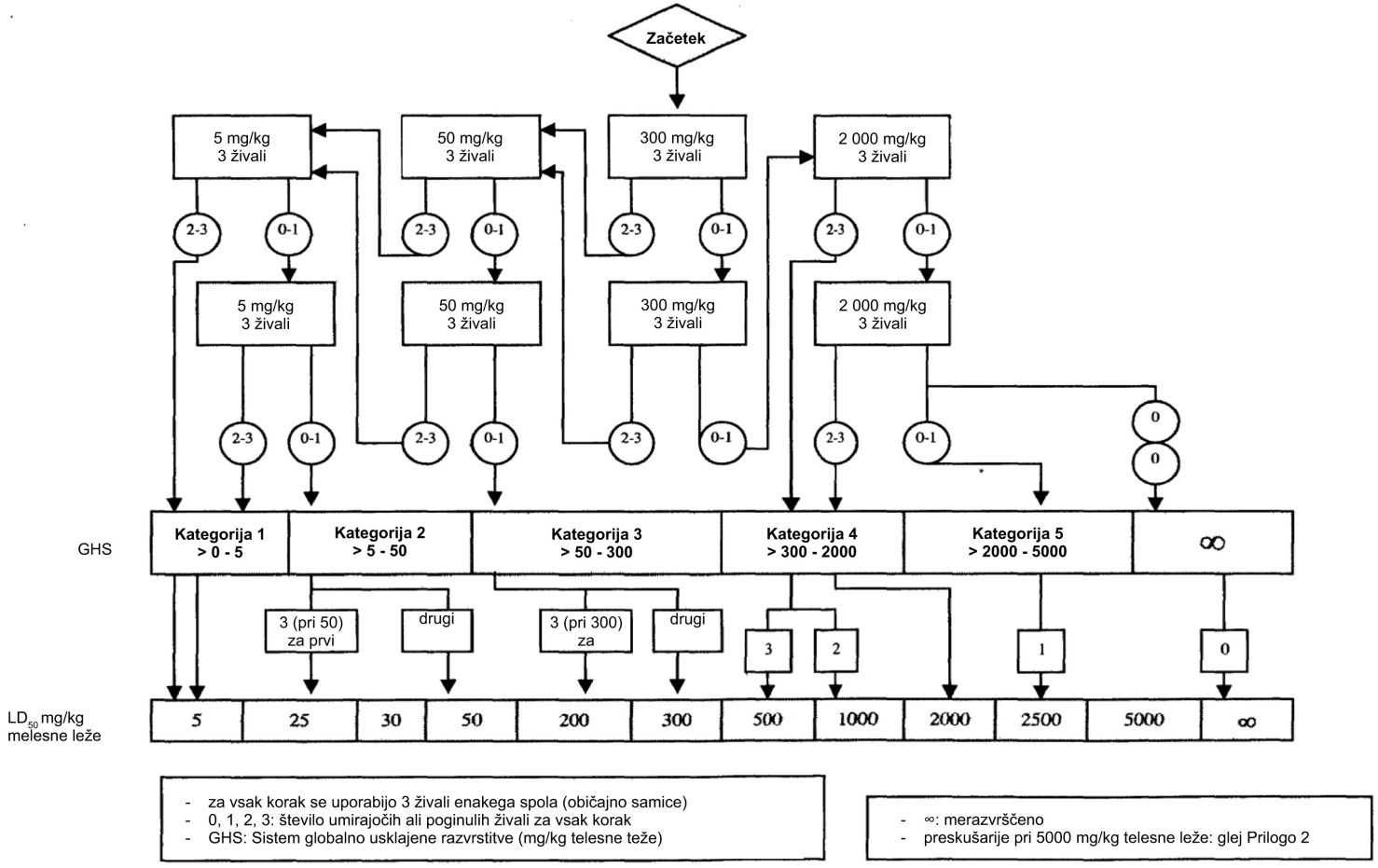
Dodatek 1 B

POSTOPEK PRESKUSA Z ZAČETNIM ODMERKOM 50 MG/KG TELESNE TEŽE



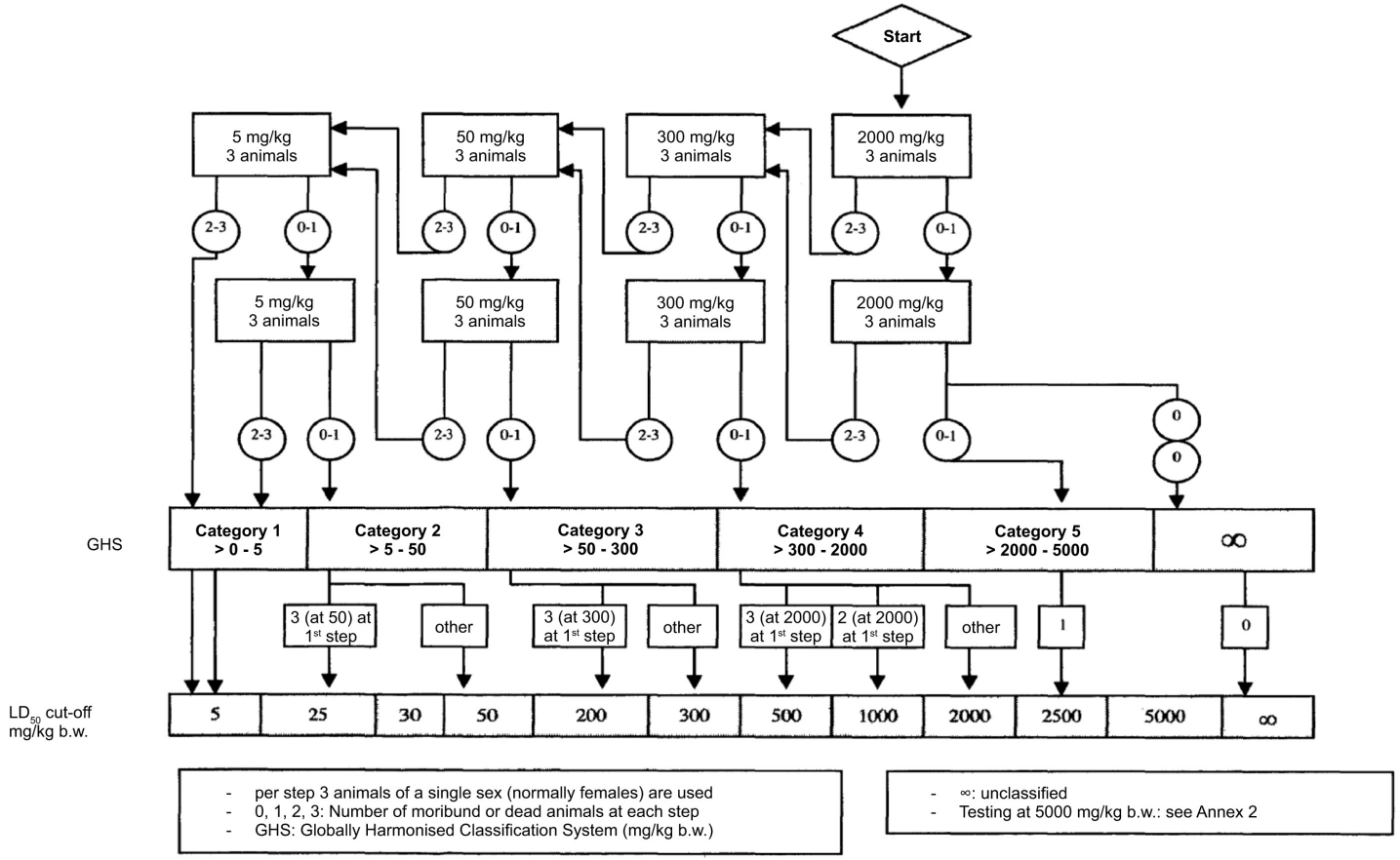
Dodatek 1 C

POSTOPEK PRESKUSA Z ZAČETNIM ODMERKOM 300 MG/KG TELESNE TEŽE



Dodatek 1 D

POSTOPEK PRESKUSA Z ZAČETNIM ODMERKOM 2 000 MG/KG TELESNE TEŽE



▼B

Dodatek 2

KRITERIJI ZA RAZVRSTITEV PRESKUSNIH SNOVI S PRIČAKOVANIMI VREDNOSTMI LD_{50}, KI PRESEGAJO 2 000 MG/KG, NE DA BI BILO POTREBNO PRESKUŠANJE

Kriteriji za kategorijo nevarnih snovi 5 so namenjeni omogočanju identifikacije preskusnih snovi, katerih toksičnost je sorazmerno malo nevarna, vendar lahko v točno določenih okoliščinah predstavljajo nevarnost za ranljivo populacijo. Za te snovi se predvideva, da imajo oralni ali kožni LD_{50} v območju 2 000-5 000 mg/kg ali enakovrednih odmerkov za druge poti vnosa. Preskusne snovi se lahko uvrstijo v kategorijo nevarnih snovi, opredeljeno kot: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategorija 5 v GHS) v naslednjih primerih:

(a) če so uvrščene v to kategorijo po kateri koli od shem preskušanja iz dodatkov l a–l d na podlagi pogostnosti smrti;

(b) če so že na voljo dokazi, ki kažejo na to, da je LD_{50} v razponu vrednosti kategorije 5; ali če druge študije na živalih ali toksičnih učinkih na ljudi kažejo zaskrbljenost zaradi njihove akutnosti;

(c) z ekstrapolacijo, ocenitvijo ali meritvijo podatkov, če dodelitev višjemu razredu nevarnih snovi ni zajamčena, in

— so na voljo zanesljive informacije, ki kažejo na toksične učinke pri ljudeh ali

— se opazi kakršna koli smrtnost pri preskušanju do vrednostmi kategorije 4 po oralni poti ali

— kadar strokovna presoja potrdi pomembne klinične znake toksičnosti pri preskušanju do vrednosti kategorije 4, z izjemo driske, piloerekcije ali nenormalnega videza, ali

— kadar strokovna presoja potrdi zanesljive informacije, ki kažejo na možnost pomembnih akutnih učinkov iz drugih študij na živalih.

PRESKUŠANJE Z ODMERKI NAD 2 000 MG/KG

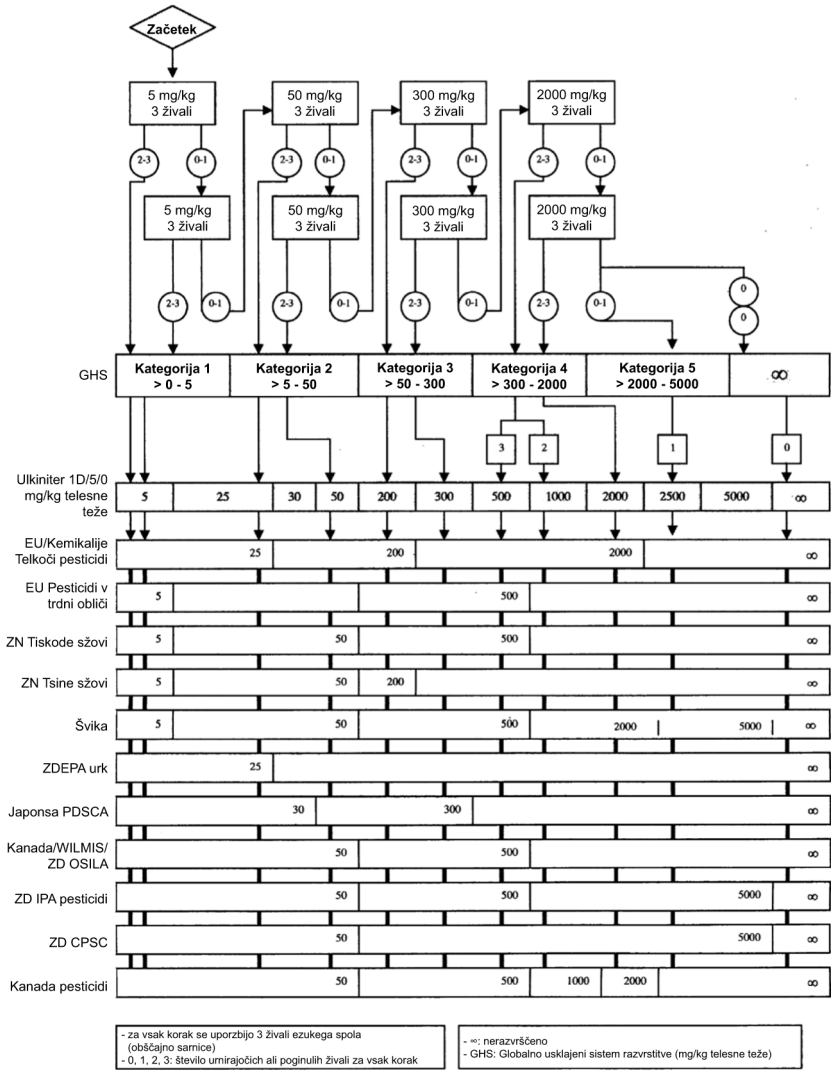
Zaradi potrebe po zaščiti zdravja živali je preskušanje živali v razponih kategorije 5 (2 000 mg/kg) nezaželeno in bi ga morali upoštevati le, kadar obstaja velika verjetnost, da bi rezultati takšnega preskušanja imeli neposreden pomen za zaščito ljudi ali zdravje živali (10). Nadaljnje preskušanje se ne sme opravljati z večjimi velikostmi odmerkov.

Kadar je potrebno preskušanje odmerka 5 000 mg/kg, je potreben le en korak (to pomeni tri živali). Če prve žival odmerjanja pogine, se odmerjanje nadaljuje pri 2 000 mg/kg v skladu s tabelami poteka iz Dodatka 1. Če prva žival preživi, se preskušata nadaljnji dve živali. Če pogine le ena od treh živali, se za vrednost LD_{50}, da bo presegla 5 000 mg/kg. Če pogineta obe živali, se odmerjanje nadaljuje z 2 000 mg/kg.

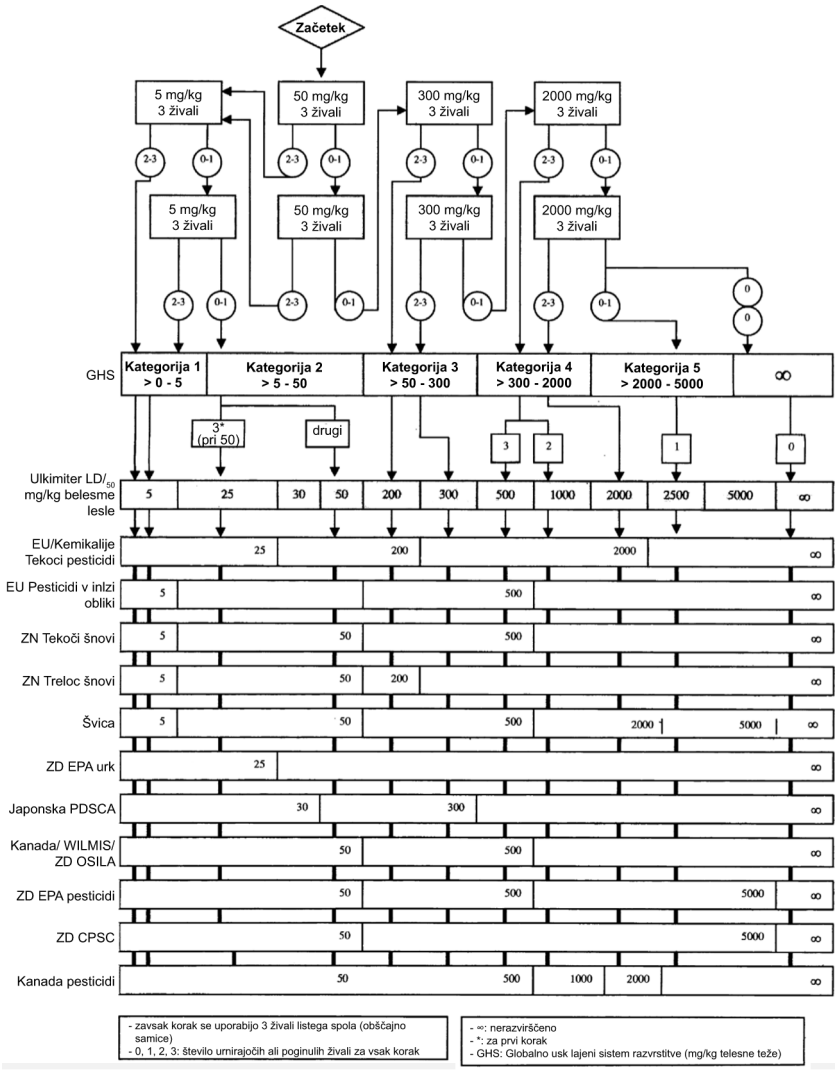
▼B

Dodatek 3

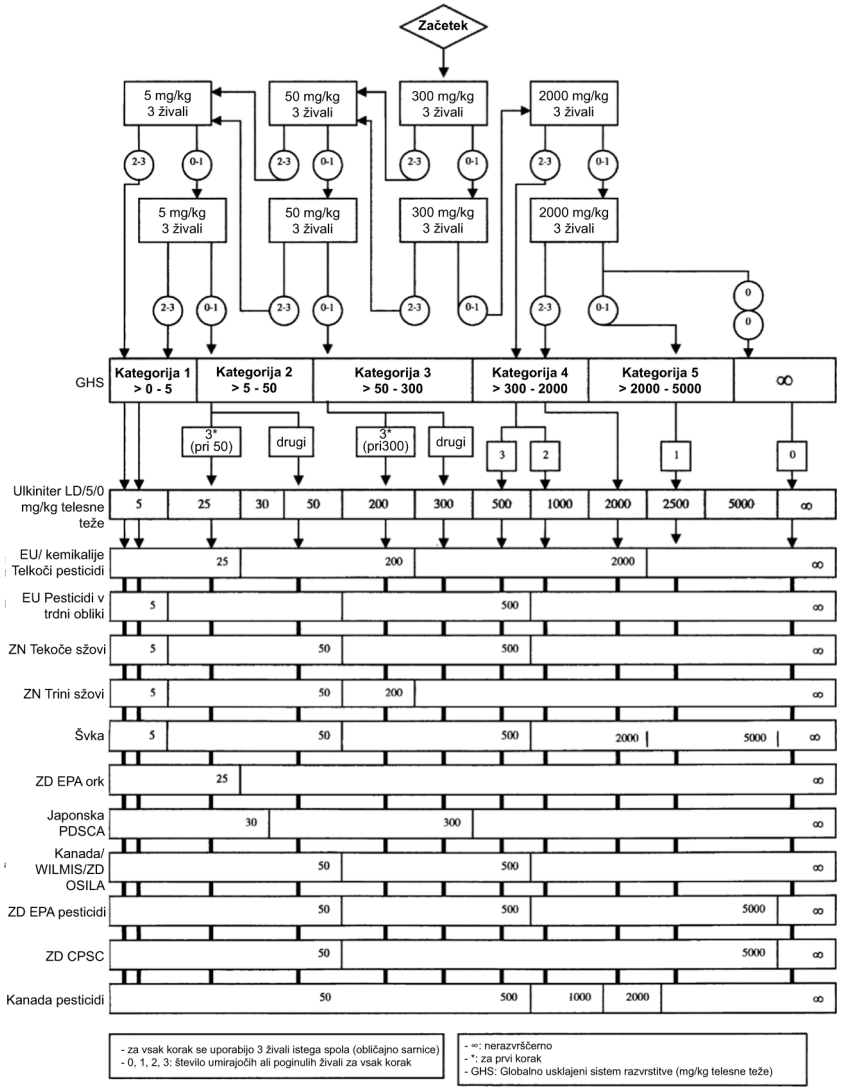
PRESKUSNA METODA B.1 bis. Napotki za razvrstitev v skladu s shemo EU za prehodno obdobje do popolne uveljavitve Globalno usklajenega sistema razvrstitve (GHS) (vzeto iz sklica (8))



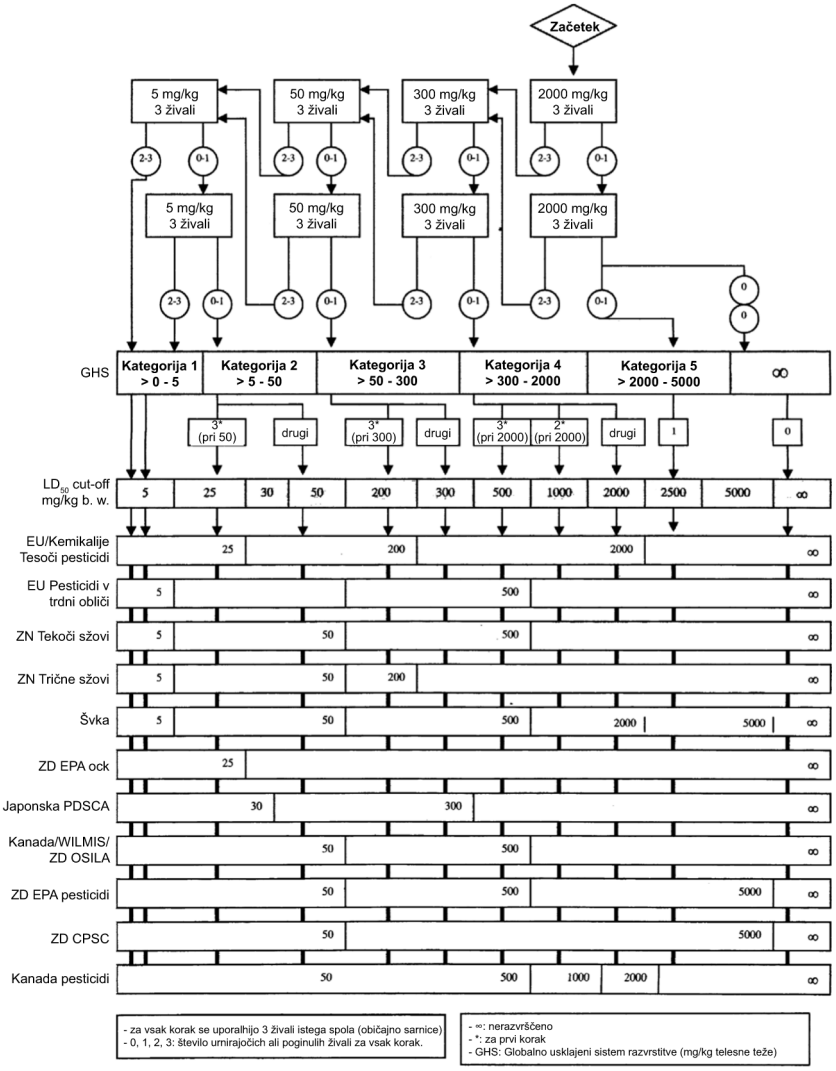
▼B


Začetek
5 mg/kg 3 živali
50 mg/kg 3 živali
300 mg/kg 3 živali
2000 mg/kg 3 živali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (pri 50)
drugi
3
2
1
0
Ulkimiter LD50 mg/kg belesne lesle
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/Kemikalije Tekoci pesticidi
EU Pesticidi v inlzi obliki
ZN Tekoči šnovi
ZN Treloc šnovi
Švica
ZD EPA urk
Japonska PDSCA
Kanada/ WILMIS/ ZD OSILA
ZD EPA pesticidi
ZD CPSC
Kanada pesticidi
- zavsak korak se uporabijo 3 živali listega spola (obščajno samice)
- 0, 1, 2, 3: število umirajočih ali poginulih živali za vsak korak
- ∞: nerazviršćeno
- *: za prvi korak
- GHS: Globalno usk lajeni sistem razvrstitve (mg/kg telesne teže)

▼B


Začetek
5 mg/kg 3 živali
50 mg/kg 3 živali
300 mg/kg 3 živali
2000 mg/kg 3 živali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (pri 50)
drugi
3* (pri300)
Ulkiniter LD/5/0 mg/kg telesne teže
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/ kemikalije Telkoči pesticidi
EU Pesticidi v trdni obliki
ZN Tekoče sžovi
ZN Trini sžovi
Švka
ZD EPA ork
Japonska PDSCA
Kanada/ WILMIS/ZD OSILA
ZD EPA pesticidi
ZD CPSC
Kanada pesticidi
- za vsak korak se uporabijo 3 živali istega spola (običajno samice)
- 0, 1, 2, 3: število umirajočih ali poginulih živali za vsak korak
- ∞: nerazvrščerno
- *: za prvi korak
- GHS: Globalno usklajeni sistem razvrstitve (mg/kg telesne teže)

▼B


Začetek
5 mg/kg 3 živali
50 mg/kg 3 živali
300 mg/kg 3 živali
2000 mg/kg 3 živali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (pri 50)
drugi
3* (pri 300)
3* (pri 2000)
2* (pri 2000)
1
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/Kemikalije Tesoči pesticidi
EU Pesticidi v trdni obliči
ZN Tekoči sžovi
ZN Trične sžovi
Švka
ZD EPA ock
Japonska PDSCA
Kanada/WILMIS/ ZD OSILA
ZD EPA pesticidi
ZD CPSC
Kanada pesticidi
- za vsak korak se uporalhijo 3 živali istega spola (običajno samice)
- 0, 1, 2, 3: število umirajočih ali poginulih živali za vsak korak.
- ∞: nerazvrščeno
- *: za prvi korak
- GHS: Globalno usklajeni sistem razvrstitve (mg/kg telesne teže)

▼M4

B.2 AKUTNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD 403 (2009) (1). Prvotna Smernica za preskušanje 403 v zvezi z akutno strupenostjo pri vdihavanju (TG 403) je bila sprejeta leta 1981. Ta revidirana preskusna metoda B.2 (ki ustreza revidirani TG 403) je bila zasnovana tako, da omogoča večjo prožnost, zmanjšuje uporabo živali in izpolnjuje zakonodajne potrebe. V revidirani preskusni metodi sta predstavljeni dve vrsti študij: tradicionalni protokol LC_{50} in protokol koncentracija × čas (C × t). Glavni značilnosti te preskusne metode sta, da je z njo mogoče dobiti razmerje koncentracija-odziv, ki se giblje od nesmrtnih do smrtnih rezultatov, za določitev srednje smrtne koncentracije (LC_{50}), nesmrtne mejne koncentracije (npr. LC_{01}) in naklona, ter opredeliti morebitno občutljivost glede na spol. Protokol C × t je treba uporabiti v primeru posebne zakonodajne ali znanstvene potrebe po preskušanju živali v več časovnih obdobjih, na primer za namene načrtovanja odzivanja v nujnih primerih (npr. določanja orientacijskih ravni pri akutni izpostavljenosti (AEGL), smernic za načrtovanje zaščite in reševanja (ERPG) ali vrednosti mejnih ravni pri akutni izpostavljenosti (AETL)) ali načrtovanja rabe tal.

2. Napotke glede izvedbe in razlage študij te preskusne metode je mogoče najti v Dokumentu s smernicami za preskušanje akutne strupenosti pri vdihavanju (GD 39) (2).

3. Pojmi, ki se uporabljajo v tej preskusni metodi, so opredeljeni na koncu tega poglavja in v GD 39 (2).

4. Ta preskusna metoda omogoča opredelitev lastnosti in kvantitativno oceno tveganja preskusnih kemikalij ter njihovo razvrščanje v skladu z Uredbo (ES) št. 1272/2008 (3). GD 39 (2) zagotavlja napotke za izbiro primerne metode za preskušanje akutne strupenosti. Kadar so potrebne samo informacije o razvrščanju in označevanju, se navadno priporoča poglavje B.52 te priloge (4) (glej GD 39 (2)). Ta preskusna metoda B.2 ni posebej namenjena preskušanju posebnih materialov, kot so slabo topni izometrični ali vlaknati materiali ali proizvedeni nanomateriali.

ZAČETNI PREUDARKI

5. Da se čim bolj zmanjša uporaba živali, mora preskuševalni laboratorij pred razmislekom o preskušanju v skladu s to preskusno metodo preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji, vključno z obstoječimi študijami (npr. poglavje B.52 te priloge (4)), katerih podatki bi omogočili izognitev dodatnemu preskušanju. Informacije, ki lahko pomagajo pri izbiri najprimernejše vrste, seva, spola, načina izpostavljenosti in ustreznih preskusnih koncentracij, vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR in toksikološke podatke o strukturno sorodnih snoveh (glej GD 39 (2)).

▼M4

6. Preskušanju jedkih in/ali dražilnih preskusnih kemikalij pri koncentracijah, za katere se pričakuje, da bodo povzročile hude bolečine in/ali trpljenje, se je treba čim bolj izogibati. Jedki/dražilni potencial je treba oceniti s strokovno presojo ob uporabi dokazov, kot so izkušnje pri ljudeh in živalih (npr. iz študij s ponavljajočimi se odmerki, opravljenih pri nejedkih/nedražilnih koncentracijah), obstoječi podatki *in vitro* (npr. iz poglavij B.40 (5) in B.40 bis (6) te priloge ali iz OECD TG 435 (7)), vrednosti pH, informacije o podobnih snoveh ali kateri koli drugi pomembni podatki, da se razišče, ali je mogoče nadaljnje preskušanje opustiti. Za posebne zakonodajne potrebe (npr. pri načrtovanju odzivanja v nujnih primerih) se lahko ta preskusna metoda uporabi za izpostavljanje živali tem snovem, ker vodji ali glavnemu raziskovalcu študije zagotavlja nadzor nad izbiro ciljnih koncentracij. Ciljne koncentracije ne smejo povzročiti resnih dražilnih/jedkih učinkov, morajo pa biti zadostne za razširitev krivulje koncentracija-odziv na ravni, ki izpolnjuje zakonodajni in znanstveni cilj preskusa. Te koncentracije je treba izbrati za vsak primer posebej in utemeljiti njihovo izbiro (glej GD 39 (2)).

NAČELO PRESKUSA

7. Ta revidirana preskusna metoda B.2 je bila zasnovana za pridobitev zadostnih informacij o akutni strupenosti preskusne kemikalije, da se omogoči njena razvrstitev in zagotovijo podatki o smrtnosti (npr. $LC_{50,}$ LC_{01} in naklon) za enega ali oba spola – kot je potrebno za kvantitativne ocene tveganja. Ta preskusna metoda vključuje dve metodi. Prva je tradicionalni protokol, pri katerem so skupine živali izpostavljene mejni koncentraciji (mejni preskus) ali seriji koncentracij v postopnem postopku za vnaprej določeno obdobje, običajno 4 ure. Za izpolnitev posebnih zakonodajnih namenov se lahko uporabijo tudi druga obdobja izpostavljenosti. Druga metoda je protokol C × t, pri katerem so skupine živali izpostavljene eni (mejni) koncentraciji ali seriji koncentracij skozi več obdobij.

8. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo bolečine ali kažejo znake hudega in trajnega trpljenja, je treba humano usmrtiti ter jih pri razlagi rezultatov preskusa upoštevati enako kot živali, ki so poginile med preskusom. Merila za sprejem odločitve o usmrtitvi umirajočih živali ali živali, ki zelo trpijo, in napotki za prepoznavanje predvidljive ali neizbežne smrti so obravnavani v Dokumentu s smernicami OECD št. 19 o humanih končnih točkah (8).

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

9. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Najprimernejša vrsta je podgana, uporabo drugih vrst pa je treba utemeljiti.

Priprava živali

10. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje. Na dan izpostavljenosti morajo biti živali mladi odrasli primerki, ki so stari 8–12 tednov in tehtajo ± 20 % srednje teže za posamezni spol vseh predhodno izpostavljenih živali iste starosti. Živali se izberejo naključno in označijo za posamično prepoznavanje. Pred začetkom preskusa so najmanj 5 dni v kletkah, da se prilagodijo laboratorijskim razmeram. Poleg tega jih je treba pred preskušanjem krajše obdobje privajati na preskusno aparaturo, saj se tako zmanjša stres, ki ga povzroči uvedba v novo okolje.

▼M4

Oskrba živali

11. Temperatura v prostoru za oskrbo preskusnih živali mora biti 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, čeprav to morda ne bo mogoče, kadar se kot nosilec uporablja voda. Pred izpostavljanjem in po njem morajo biti živali v kletkah na splošno združene v skupine po spolu in koncentraciji, pri čemer število primerkov na kletko ne sme vplivati na neovirano opazovanje posamezne živali ter mora kar najbolj zmanjšati izgube zaradi kanibalizma in spopadov. Kadar bo izpostavljen samo nos živali, jih bo morda treba privajati na zadrževalne cevi. Te živalim ne smejo povzročati prevelikega fizičnega ali toplotnega stresa ali stresa zaradi imobilizacije. Omejevanje gibanja lahko vpliva na fiziološke končne točke, kot sta telesna temperatura (hipertermija) in/ali minutni dihalni volumen. Če so na voljo splošni podatki, ki kažejo, da se takih sprememb ne pojavi zelo veliko, predhodno prilagajanje zadrževalnim cevem ni potrebno. Živali, ki se izpostavijo aerosolu s celim telesom, morajo biti med izpostavljenostjo nastanjene posamično, da preskusnega aerosola ne morejo filtrirati preko kožuhov drugih primerkov v kletki. Razen med izpostavljenostjo se lahko uporablja običajna in potrjena laboratorijska hrana, ki jo spremlja neomejena količina pitne vode iz komunalnega omrežja. Osvetlitev mora biti umetna z zaporedjem 12 ur svetlobe/12 ur teme.

Inhalacijske komore

12. Pri izbiri inhalacijske komore je treba upoštevati lastnosti preskusne kemikalije in cilj preskusa. Po možnosti se kot način izpostavljenosti uporabi izpostavljenost nosu (imenovana tudi izpostavljenost glave oziroma smrčka). Izpostavljenost nosu je navadno najprimernejša za študije tekočih ali trdnih aerosolov ter za hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole. Mogoče je, da bo posebne cilje študije lažje doseči z izpostavljenostjo celega telesa, vendar je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. Kadar se uporablja komora za izpostavljanje celega telesa, skupni volumen preskusnih živali ne sme presegati 5 % prostornine komore, da se zagotovi stabilnost atmosfere. Načela tehnik izpostavljanja nosu in celega telesa ter njune prednosti in pomanjkljivosti so opisani v GD 39 (2).

POGOJI IZPOSTAVLJENOSTI

Dajanje koncentracij

13. Izpostavljenost nosu lahko pri podganah traja do 6 ur. Če se uporabljajo miši, izpostavljenost nosu navadno ne sme biti daljša od 4 ur. Če so potrebne dolgoročnejše študije, je treba to utemeljiti (glej GD 39 (2)). Živali, ki so izpostavljene aerosolom v komorah za izpostavljanje celega telesa, morajo biti nastanjene posamično, da se prepreči zaužitje preskusne kemikalije ob medsebojnem čiščenju primerkov v kletki. V obdobju izpostavljenosti je treba živalim odrekati hrano. Med izpostavljenostjo celega telesa lahko ves čas uživajo vodo.

14. Živali se izpostavijo preskusni kemikaliji v obliki plina, hlapov, aerosola ali njihovih zmesi. Agregatno stanje, ki bo preskušeno, je odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, izbrane koncentracije in/ali fizikalne oblike, ki bo najverjetneje prisotna med ravnanjem s preskusno kemikalijo in njeno uporabo. Higroskopne in kemično reaktivne preskusne kemikalije je treba preskušati v suhem ozračju. Paziti je treba, da ne nastanejo eksplozivne koncentracije.

▼M4

Porazdelitev velikosti delcev

15. Za vse aerosole in hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole, je treba določiti velikost delcev. Da se omogoči izpostavljenost vseh ustreznih predelov dihal, so priporočeni aerosoli, katerih mediana porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) znaša 1–4 μm z geometričnim standardnim odklonom (σg) 1,5–3,0 (2) (9) (10). Prizadevanje za izpolnitev tega standarda naj bo razumno; če ga ni mogoče izpolniti, je treba zagotoviti strokovno presojo. Delci kovinskih hlapov so lahko na primer manjši od tega standarda, naelektreni delci, vlakna in higroskopne snovi (katerih velikost se v vlažnem okolju dihal poveča) pa presegajo navedene vrednosti.

Priprava preskusne kemikalije v nosilcu

16. Za ustvarjanje primerne koncentracije in velikosti delcev preskusne kemikalije v atmosferi se lahko uporabi nosilec. Praviloma je treba prednostno uporabiti vodo. Za snov, ki jo tvorijo delci, se lahko uporabijo mehanski postopki, da se doseže zahtevana porazdelitev velikosti delcev, vendar je treba paziti, da preskusna kemikalija ne razpade ali se spremeni. Kadar se zdi, da so mehanski postopki spremenili sestavo preskusne kemikalije (npr. ob zelo visokih temperaturah, nastalih zaradi trenja pri pretiranem mletju), je treba sestavo te preskusne kemikalije analitsko preveriti. Skrbno je treba paziti, da se preskusna kemikalija ne kontaminira. Nekrušljivih granulatov, ki so namenoma formulirani tako, da jih ni mogoče vdihniti, ni treba preskušati. Uporabiti je treba preskus drobljivosti, da se dokaže, da pri ravnanju z granulatom ne nastajajo delci, ki jih je mogoče vdihniti. Če pri preskusu drobljivosti nastanejo snovi, ki jih je mogoče vdihniti, je treba opraviti preskus strupenosti pri vdihavanju.

Kontrolne živali

17. Sočasna negativna kontrolna skupina (z zrakom) ni potrebna. Kadar se v pomoč pri ustvarjanju preskusne atmosfere uporablja nevodni nosilec, je treba kontrolno skupino z nosilcem uporabiti samo, če niso na voljo pretekli podatki o strupenosti pri vdihavanju. Če študija strupenosti preskusne kemikalije, formulirane v nosilcu, ne pokaže strupenosti, iz tega sledi, da nosilec pri preskušeni koncentraciji ni strupen; kontrola z nosilcem torej ni potrebna.

SPREMLJANJE POGOJEV IZPOSTAVLJENOSTI

Pretok zraka v komori

18. Pretok zraka skozi komoro je treba med vsako izpostavljenostjo skrbno nadzorovati, stalno spremljati in zabeležiti najmanj vsako uro. Spremljanje koncentracije (ali stabilnosti) preskusne atmosfere je meritev, ki je neločljivo povezana z vsemi dinamičnimi parametri in zagotavlja posredno sredstvo za nadzor nad vsemi pomembnimi dinamičnimi parametri ustvarjanja atmosfere. Pri komorah za izpostavljanje nosu je treba posebno pozornost nameniti preprečevanju ponovnega vdihavanja v primerih, v katerih pretok zraka skozi sistem izpostavljanja ni zadosten za zagotovitev dinamičnega toka atmosfere s preskusno kemikalijo. Za dokazovanje, da v izbranih pogojih postopka ni ponovnega vdihavanja, so na voljo predpisane metodologije (2) (11). Koncentracija kisika mora znašati najmanj 19 %, koncentracija ogljikovega dioksida pa ne sme presegati 1 %. Če obstaja razlog za domnevo, da teh standardov ni mogoče izpolniti, je treba koncentraciji kisika in ogljikovega dioksida izmeriti.

▼M4

Temperatura in relativna vlažnost v komori

19. Temperaturo v komori je treba ohranjati pri 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost v območju dihanja živali je treba pri izpostavljenosti nosu in izpostavljenosti celega telesa spremljati ter jo zabeležiti najmanj trikrat, če izpostavljenost traja do 4 ure, medtem ko se pri krajših časih izpostavljenosti ta meritev zabeleži vsako uro. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, vendar je to lahko bodisi nedosegljivo (npr. pri preskušanju zmesi na vodni osnovi) bodisi nemerljivo zaradi interference preskusne kemikalije s preskusno metodo.

Preskusna kemikalija: nazivna koncentracija

20. Vedno, kadar je to izvedljivo, je treba izračunati in zabeležiti nazivno koncentracijo v komori za izpostavljanje. Nazivna koncentracija je masa ustvarjene preskusne kemikalije, deljena s skupnim volumnom zraka, ki preide skozi sistem komore. Nazivna koncentracija se ne uporablja za opredeljevanje izpostavljenosti živali, pač pa pri primerjavi z dejansko koncentracijo pokaže, kako učinkovito je ustvarjanje preskusnega sistema, in se torej lahko uporabi za odkrivanje težav pri tem ustvarjanju.

Preskusna kemikalija: dejanska koncentracija

21. Dejanska koncentracija je koncentracija preskusne kemikalije v območju dihanja živali v inhalacijski komori. Meri se s specifičnimi metodami (npr. z neposrednim vzorčenjem, adsorpcijskimi ali kemičnimi reaktivnimi metodami in naknadnim analitskim opredeljevanjem) ali nespecifičnimi metodami, kot je gravimetrična analiza s filtriranjem. Uporaba gravimetrične analize je sprejemljiva samo za enokomponentne prašne aerosole ali aerosole tekočin z majhno hlapnostjo ter jo je treba pred študijo podpreti z ustreznimi opredelitvami, specifičnimi za preskusno kemikalijo. Z gravimetrično analizo se lahko določi tudi koncentracija večkomponentnega prašnega aerosola, vendar so za to potrebni analitski podatki, ki kažejo, da je sestava snovi v zraku podobna začetni snovi. Če te informacije niso na voljo, bo morda treba med študijo znova analizirati preskusno kemikalijo (po možnosti takrat, ko lebdi v zraku) v rednih intervalih. Za aerosolizirane snovi, ki lahko izhlapijo ali sublimirajo, je treba prikazati, da so bile vse faze zbrane z izbrano metodo. V poročilu o študiji je treba navesti ciljne, nazivne in dejanske koncentracije, vendar se v statističnih analizah za izračun vrednosti smrtnih koncentracij uporabljajo samo dejanske koncentracije.

22. Po možnosti je treba uporabiti eno serijo preskusne kemikalije, preskusni vzorec pa je treba hraniti v pogojih, v katerih se ohranjajo njegova čistost, homogenost in stabilnost. Pred začetkom študije je treba opredeliti lastnosti preskusne kemikalije, vključno z njeno čistostjo ter, če je to tehnično izvedljivo, identiteto in količinami ugotovljenih kontaminantov in nečistot. To se lahko med drugim prikaže z naslednjimi podatki: z retencijskim časom in relativno površino vrha, molekulsko maso, ugotovljeno na podlagi analiz z masno spektroskopijo ali plinsko kromatografijo, ali z drugimi ocenami. Čeprav identiteta preskusnega vzorca ni odgovornost preskuševalnega laboratorija, je morda smotrno, da ta vsaj delno potrdi naročnikovo opredelitev lastnosti (npr. barvo, agregatno stanje itd.).

23. Atmosfera v komori za izpostavljanje naj bo konstantna, kolikor je to izvedljivo, ter naj se glede na analitsko metodo spremlja stalno in/ali v rednih intervalih. Kadar se uporablja vzorčenje v intervalih, je treba v štiriurni študiji vzorce atmosfere v komori vzeti najmanj dvakrat. Če to zaradi omejenih stopenj pretoka zraka ali nizkih koncentracij ni izvedljivo, se lahko v celotnem obdobju izpostavljenosti vzame en vzorec. Če se med

▼M4

posameznimi vzorci pojavijo izrazita nihanja, je treba pri preskušanju naslednjih koncentracij uporabiti štiri vzorce na izpostavljenost. Posamezni vzorci koncentracije v komori od srednje koncentracije ne smejo odstopati za več kot ± 10 % za pline in hlape oziroma za več kot ± 20 % za tekoče ali trdne aerosole. Izračunati in zabeležiti je treba čas do vzpostavitve ravnotežja v komori (t_{95}). Čas izpostavljenosti pokriva čas ustvarjanja preskusne kemikalije, pri tem pa je upoštevan čas, potreben za dosego t_{95}. Napotki za ocenjevanje t_{95} so na voljo v GD 39 (2).

24. Pri zelo kompleksnih zmeseh, sestavljenih iz plinov/hlapov in aerosolov (npr. zgorevalnih atmosfer in preskusnih kemikalij, potiskanih iz namenskih proizvodov/naprav za posebno uporabo), se lahko v inhalacijski komori vsaka faza obnaša drugače, zato je treba za vsako fazo (plin/hlape in aerosol) izbrati najmanj eno indikatorsko snov (analit), ki je navadno glavna aktivna snov v zmesi. Kadar je preskusna kemikalija zmes, je treba analitsko koncentracijo navesti za zmes in ne le za aktivno snov ali sestavino (analit). Dodatne informacije o dejanskih koncentracijah so na voljo v GD 39 (2).

Preskusna kemikalija: porazdelitev velikosti delcev

25. Porazdelitev velikosti delcev aerosolov je treba med vsako 4-urno izpostavljenostjo določiti vsaj dvakrat s kaskadnim impaktorjem ali nadomestnim instrumentom, kot je aerodinamični merilnik delcev. Če je mogoče prikazati enakovrednost rezultatov, dobljenih s kaskadnim impaktorjem in nadomestnim instrumentom, se lahko nadomestni instrument uporablja skozi celotno študijo. Vzporedno s primarnim instrumentom je treba za potrditev njegove učinkovitosti zbiranja uporabljati še drugo napravo, kot je gravimetrični filter ali (plinska) izpiralka. Masna koncentracija, dobljena z analizo velikosti delcev, mora biti v razumnih mejah masne koncentracije, dobljene z analizo s filtriranjem (glej GD 39 (2)). Če je enakovrednost mogoče prikazati zgodaj v študiji, se lahko nadaljnje potrditvene meritve opustijo. Zaradi dobrobiti živali je treba sprejeti ukrepe, s katerimi se čim bolj zmanjša količina pomanjkljivih podatkov, zaradi katerih bi bilo treba izpostavljanje ponoviti. Za hlape je treba velikost delcev določiti, če obstaja možnost, da se bodo hlapi kondenzirali v aerosol, ali če se v atmosferi s hlapi, v kateri so mogoče mešane faze, zaznajo delci (glej odstavek 15).

POSTOPEK

26. V nadaljevanju sta opisani dve vrsti študij: tradicionalni protokol in protokol C × t. Oba lahko vključujeta opazovalno študijo, glavno študijo in/ali mejni preskus (tradicionalni protokol) oziroma preskušanje pri mejni koncentraciji (C × t). Če je znano, da je en spol občutljivejši, se lahko vodja študije odloči te študije izvesti samo z njim. Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljša obdobja izpostavljenosti prilagodijo, da se čim bolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Pred začetkom je treba preučiti vse razpoložljive podatke, da se kar najbolj zmanjša uporaba živali. Tako se lahko na primer s podatki, pridobljenimi na podlagi poglavja B.52 te priloge (4), odpravi potreba po opazovalni študiji in dokaže večja občutljivost enega spola (glej GD 39 (2)).

▼M4

TRADICIONALNI PROTOKOL

Splošni preudarki: tradicionalni protokol

27. Pri tradicionalni študiji se skupine živali za točno določen čas (običajno 4 ure) izpostavijo preskusni kemikaliji bodisi v komori za izpostavljanje nosu bodisi v komori za izpostavljanje celega telesa. Živali se izpostavijo bodisi mejni koncentraciji (mejni preskus) bodisi najmanj trem koncentracijam v postopnem postopku (glavna študija). Pred glavno študijo se lahko izvede opazovalna študija, razen če so že na voljo nekatere informacije o preskusni kemikaliji, kot je predhodno izvedena študija B.52 (glej GD 39 (2)).

Opazovalna študija: tradicionalni protokol

28. Opazovalna študija se uporablja za ocenjevanje moči preskusne kemikalije, opredelitev razlik med spoloma glede občutljivosti in pomoč pri izbiri koncentracij izpostavljenosti za glavno študijo ali mejni preskus. Pri izbiri koncentracij za opazovalno študijo je treba uporabiti vse informacije, ki so na voljo, vključno z razpoložljivimi podatki (Q)SAR in podatki za podobne kemikalije. Vsaki koncentraciji se izpostavi največ tri samce in tri samice (3 živali/spol so lahko potrebne, da se ugotovi razlika med spoloma). Opazovalna študija lahko zajema eno samo koncentracijo, po potrebi pa se jih lahko preskusi tudi več. Opazovalna študija ne sme vključevati toliko živali in koncentracij, da je podobna glavni študiji. Namesto opazovalne študije se lahko uporabi predhodno izvedena študija B.52 (4) (glej GD 39 (2)).

Mejni preskus: tradicionalni protokol

29. Mejni preskus se uporabi, kadar je znano ali se pričakuje, da je preskusna kemikalija praktično nestrupena, tj. da povzroči toksično reakcijo samo nad zakonsko predpisano mejno koncentracijo. Pri mejnem preskusu se ena skupina treh samcev in treh samic izpostavi preskusni kemikaliji pri mejni koncentraciji. Informacije o strupenosti preskusne kemikalije se lahko pridobijo na podlagi znanja o podobnih preskušenih kemikalijah ob upoštevanju identitete in odstotka sestavin, za katere je znano, da so toksikološko pomembne. Kadar je informacij o strupenosti preskusne kemikalije malo oziroma jih ni ali kadar se pričakuje, da je kemikalija strupena, je treba opraviti glavni preskus.

30. Izbira mejnih koncentracij je navadno odvisna od zakonodajnih zahtev. Kadar se uporablja Uredba (ES) št. 1272/2008, so mejne koncentracije za pline, hlape in aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l oziroma 5 mg/l (ali najvišje dosegljive koncentracije) (3). Ustvarjanje mejnih koncentracij nekaterih preskusnih kemikalij, zlasti kemikalij v obliki hlapov in aerosolov, je lahko tehnično zahtevno. Pri preskušanju aerosolov mora biti glavni cilj ustvariti delce takšne velikosti, da jih je mogoče vdihniti (MMAD 1–4 μm). To je mogoče z večino preskusnih kemikalij pri koncentraciji 2 mg/l. Preskušanje aerosolov pri koncentracijah, višjih od 2 mg/l, se lahko izvaja samo, če se lahko zagotovi delce takšne velikosti, da jih je mogoče vdihniti (glej GD 39 (2)). V Uredbi (ES) št. 1272/2008 se zaradi dobrobiti živali (3) preskušanje nad mejno koncentracijo odsvetuje. Tako preskušanje se lahko predvidi samo, kadar obstaja velika verjetnost, da bodo rezultati takega preskusa neposredno pomembni za varovanje zdravja ljudi (3), poleg tega pa je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. V primeru potencialno eksplozivnih preskusnih kemikalij je treba paziti, da se ne ustvarijo ugodni pogoji za eksplozijo. Zaradi izogibanja nepotrebni uporabi živali je treba pred mejnim preskusom opraviti preskus brez živali in tako zagotoviti, da je v komori mogoče doseči pogoje za mejni preskus.

▼M4

31. Če se pri mejni koncentraciji opazi smrtnost ali umiranje, se lahko rezultati mejnega preskusa uporabijo kot opazovalna študija za nadaljnje preskušanje pri drugih koncentracijah (glej glavno študijo). Kadar zaradi fizikalnih ali kemijskih lastnosti preskusne kemikalije ni mogoče doseči mejne koncentracije, je treba preskusiti najvišjo dosegljivo koncentracijo. Če ta povzroči manj kot 50-odstotno smrtnost, nadaljnje preskušanje ni potrebno. Kadar mejne koncentracije ni mogoče doseči, je treba v poročilu o študiji navesti pojasnilo in podporne podatke. Če najvišja dosegljiva koncentracija hlapov ne izzove strupenih učinkov, bo morda treba preskusno kemikalijo pripraviti v obliki tekočega aerosola.

Glavna študija: tradicionalni protokol

32. Glavna študija se običajno opravlja s petimi samci in petimi samicami (ali petimi živalmi občutljivejšega spola, če je znan) na koncentracijo, pri čemer se uporabijo najmanj tri različne koncentracije. Za zanesljivo statistično analizo je treba uporabiti zadostne koncentracije. Časovni interval med skupinami za izpostavljanje je določen glede na nastop, trajanje in resnost znakov zastrupitve. Z izpostavljanjem živali naslednji stopnji koncentracije je treba počakati, dokler ni mogoče z razumno gotovostjo sklepati o preživetju predhodno preskušenih živali. Tako lahko vodja študije prilagodi ciljno koncentracijo za naslednjo skupino za izpostavljanje. Zaradi odvisnosti od kompleksnih tehnologij to pri inhalacijskih študijah morda ni vedno praktično, zato mora izpostavljanje živali naslednji stopnji koncentracije temeljiti na predhodnih izkušnjah in znanstveni presoji. Pri preskušanju zmesi je treba upoštevati GD 39 (2).

PROTOKOL KONCENTRACIJA × ČAS (C × T)

Splošni preudarki: protokol C × t

33. Postopna študija C × t se lahko obravnava kot alternativa tradicionalnemu protokolu, kadar se preskuša strupenost pri vdihavanju (12) (13) (14). Ta pristop omogoča, da se živali izpostavijo preskusni kemikaliji pri več koncentracijah in ob različnih obdobjih izpostavljenosti. Celotno preskušanje se izvaja v komori za izpostavljanje nosu (komore za izpostavljanje celega telesa za protokol C × t niso praktične). Ta protokol je ponazorjen v diagramu poteka v Dodatku 1. Simulacijska analiza je pokazala, da je mogoče s tradicionalnim protokolom in protokolom C × t dobiti zanesljive vrednosti LC_{50}, vendar je protokol C × t na splošno boljši pri zagotavljanju zanesljivih vrednosti LC_{01} in LC_{10} (15).

34. Simulacijska analiza je pokazala, da lahko uporaba dveh živali na interval C × t (po ena žival vsakega spola, če se uporabljata oba spola, ali dve živali občutljivejšega spola) na splošno zadošča, kadar se v glavni študiji preskušajo štiri koncentracije in pet obdobij izpostavljenosti. V nekaterih okoliščinah se lahko vodja študije odloči uporabiti po dve podgani vsakega spola na interval C × t (15). Uporaba dveh živali vsakega spola na koncentracijo in časovno točko lahko zmanjša izkrivljenost in spremenljivost ocen, poveča stopnjo uspešnosti ocenjevanja ter izboljša obseg intervala zaupanja. Vendar lahko v primeru nezadostnega ujemanja s podatki za ocenjevanje (ob uporabi ene živali vsakega spola ali dveh živali občutljivejšega spola) zadošča tudi peta koncentracija izpostavljenosti. Več napotkov o številu živali in koncentracij, ki jih je treba uporabiti v študiji C × t, je na voljo v GD 39 (2).

▼M4

Opazovalna študija: protokol C × t

35. Opazovalna študija se uporablja za ocenjevanje moči preskusne kemikalije in pomoč pri izbiri koncentracij izpostavljenosti za glavno študijo. Da se izbere primerna začetna koncentracija za glavno študijo in čim bolj zmanjša število uporabljenih živali, je lahko potrebna opazovalna študija z do tremi živalmi/spol/koncentracijo (za podrobnosti glej Dodatek III k GD 39 (2)). Za ugotavljanje razlike med spoloma bo morda treba uporabiti tri živali na spol. Te živali je treba izpostaviti za eno samo obdobje, ki navadno traja 240 min. Izvedljivost ustvarjanja ustreznih preskusnih atmosfer je treba oceniti med predhodnimi tehničnimi preskusi brez živali. Če so na voljo podatki o smrtnosti iz študije B.52 (4), opazovalne študije običajno ni treba opraviti. Vodja študije mora pri izbiri začetne ciljne koncentracije v študiji B.2 upoštevati vzorce smrtnosti, opažene v kateri koli razpoložljivi študiji B.52 (4) za oba spola in vse preskušene koncentracije (glej GD 39 (2)).

Začetna koncentracija: protokol C × t

36. Začetna koncentracija (izpostavitev I) (Dodatek 1) je bodisi mejna koncentracija bodisi koncentracija, ki jo vodja študije izbere na podlagi opazovalne študije. Skupine s po 1 živaljo/spol se tej koncentraciji izpostavijo za več obdobij (v trajanju npr. 15, 30, 60, 120 ali 240 minut), tako da je vseh živali skupaj 10 (celotni postopek imenujemo izpostavitev I) (Dodatek 1).

37. Izbira mejnih koncentracij je navadno odvisna od zakonodajnih zahtev. Kadar se uporablja Uredba (ES) št. 1272/2008, so mejne koncentracije za pline, hlape in aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l oziroma 5 mg/l (ali najvišje dosegljive koncentracije) (3). Ustvarjanje mejnih koncentracij nekaterih preskusnih kemikalij, zlasti kemikalij v obliki hlapov in aerosolov, je lahko tehnično zahtevno. Pri preskušanju aerosolov mora biti cilj ustvariti delce takšne velikosti, da jih je mogoče vdihniti (tj. MMAD 1–4 μm), pri mejni koncentraciji 2 mg/l. To je mogoče pri večini preskusnih kemikalij. Preskušanje aerosolov pri koncentracijah, višjih od 2 mg/l, se lahko izvaja samo, če se lahko zagotovi delce takšne velikosti, da jih je mogoče vdihniti (glej GD 39 (2)). V Uredbi (ES) št. 1272/2008 se zaradi dobrobiti živali preskušanje nad mejno koncentracijo odsvetuje. Tako preskušanje se lahko predvidi samo, kadar obstaja velika verjetnost, da bodo rezultati takega preskusa neposredno pomembni za varovanje zdravja ljudi (3), poleg tega pa je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. V primeru potencialno eksplozivnih preskusnih kemikalij je treba paziti, da se ne ustvarijo ugodni pogoji za eksplozijo. Zaradi izogibanja nepotrebni uporabi živali je treba pred preskušanjem pri začetni koncentraciji opraviti preskus brez živali in tako zagotoviti, da je v komori mogoče doseči pogoje za to koncentracijo.

38. Če se pri začetni koncentraciji opazi smrtnost ali umiranje, se lahko rezultati, dobljeni pri tej koncentraciji, uporabijo kot izhodišče za nadaljnje preskušanje pri drugih koncentracijah (glej glavno študijo). Kadar zaradi fizikalnih ali kemijskih lastnosti preskusne kemikalije ni mogoče doseči mejne koncentracije, je treba preskusiti najvišjo dosegljivo koncentracijo. Če ta povzroči manj kot 50-odstotno smrtnost, nadaljnje preskušanje ni potrebno. Kadar mejne koncentracije ni mogoče doseči, je treba v poročilu o študiji navesti pojasnilo in podporne podatke. Če najvišja dosegljiva koncentracija hlapov ne izzove strupenih učinkov, bo morda treba preskusno kemikalijo pripraviti v obliki tekočega aerosola.

▼M4

Glavna študija: protokol C × t

39. Začetna koncentracija (izpostavitev I) (Dodatek 1), preskušena v glavni študiji, je bodisi mejna koncentracija bodisi koncentracija, ki jo vodja študije določi na podlagi opazovalne študije. Če je bila med izpostavitvijo I ali po njej opažena smrtnost, se minimalna izpostavljenost (C × t), ki povzroči smrtnost, upošteva kot smernica za določitev koncentracije in obdobij izpostavljenosti za izpostavitev II. Vsaka naslednja izpostavitev je odvisna od prejšnje izpostavitve (glej Dodatek 1).

40. Za številne preskusne kemikalije rezultati, dobljeni pri začetni koncentraciji, skupaj s tremi dodatnimi izpostavitvami v okviru drobnejše časovne mreže (tj. geometrične razmaknjenosti obdobij izpostavljenosti, kot jo določa faktor med zaporednimi obdobji, običajno √2) zadoščajo za določitev razmerja smrtnosti C × t (15), čeprav lahko uporaba 5. koncentracije izpostavljenosti prinese nekatere koristi (glej Dodatek 1 in GD 39 (2)). Za matematično obdelavo rezultatov pri protokolu C × t glej Dodatek 1.

OPAZOVANJA

41. Med obdobjem izpostavljenosti je treba živali pogosto klinično opazovati. Po izpostavljenosti je treba klinična opazovanja izvajati skupno 14 dni, in sicer na dan izpostavljenosti najmanj dvakrat ali pogosteje, če to nakazuje odziv živali na tretiranje, nato pa najmanj enkrat na dan. Dolžina obdobja opazovanja ni točno določena, pač pa jo je treba določiti glede na naravo in čas nastopa kliničnih znakov ter dolžino obdobja okrevanja. Časi pojava in izginotja pokazateljev strupenosti so pomembni, zlasti če se ti znaki nagibajo k zapoznelosti. Vsa opažanja se sistematično zabeležijo, pri čemer se evidence vodijo za vsako žival posebej. Umirajoče živali ter živali, ki kažejo znake hude bolečine in/ali trajnega in hudega trpljenja, je treba zaradi njihove dobrobiti humano usmrtiti. Pri pregledih za kliničnimi pokazatelji strupenosti je treba paziti, da se začetni slab videz in prehodne spremembe v dihanju, ki so posledica postopka izpostavljanja, ne zamenjajo za strupenost, povezano s preskusno kemikalijo, ki bi zahtevala predčasno usmrtitev živali. Upoštevati je treba načela in merila, povzeta v Dokumentu s smernicami o humanih končnih točkah (GD 19) (7). Kadar se živali usmrtijo iz humanih razlogov ali so najdene poginule, je treba čas smrti zabeležiti čim natančneje.

42. Opazovanja v kletkah morajo vključevati spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznicah, v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju ter pri somatomotoričnih aktivnostih in vedenjskih vzorcih. Kadar je to mogoče, je treba zabeležiti vsa razlikovanja med lokalnimi in sistemskimi učinki. Pozorno je treba opazovati tremorje, krče, slinjenje, drisko, letargijo, spanje in komo. Z merjenjem rektalne temperature se lahko pridobijo podporni dokazi o refleksni bradipneji ali hipo-/hipertermiji, povezani s tretiranjem ali konfinacijo.

Telesna teža

43. Težo posameznih živali je treba zabeležiti enkrat v obdobju prilagajanja na okolje, na dan izpostavljenosti pred izpostavljenostjo (dan 0) ter vsaj 1., 3. in 7. dan (nato pa tedensko), poleg tega pa še ob poginu ali evtanaziji, če ta nastopi po 1. dnevu. Telesna teža se priznava kot bistveni kazalnik strupenosti, tako da je treba živali, pri katerih se v primerjavi z vrednostmi pred študijo opazi trajen upad za ≥ 20 %, skrbno spremljati. Preživele živali se ob koncu obdobja po izpostavljenosti stehtajo in humano usmrtijo.

▼M4

Patologija

44. Na vseh preskusnih živalih, vključno s tistimi, ki med preskusom poginejo ali so evtanazirane in odstranjene iz študije zaradi njihove dobrobiti, je treba opraviti makroskopsko obdukcijo. Če je ni mogoče opraviti takoj po odkritju poginule živali, je treba žival ohladiti (ne zamrzniti) na dovolj nizko temperaturo, da se avtoliza čim bolj zmanjša. Obdukcijo je treba opraviti čim prej, navadno v dnevu ali dveh. Za vsako žival je treba zabeležiti vse makroskopske patološke spremembe s posebnim poudarkom na spremembah dihal.

45. Za razširitev razlagalne vrednosti študije se lahko razmisli o dodatnih samoumevno vključenih pregledih, kot sta tehtanje pljuč preživelih podgan in/ali zagotavljanje dokazov o dražilnosti z mikroskopskim pregledom dihal. Med pregledanimi organi so lahko tudi tisti, ki kažejo makroskopske patološke znake pri živalih, ki so preživele 24 ur ali več, in organi, za katere je znano ali se pričakuje, da so prizadeti. Mikroskopski pregled celotnih dihal lahko zagotovi koristne informacije za preskusne kemikalije, ki reagirajo z vodo, kot so kisline in higroskopne preskusne kemikalije.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

46. Zagotoviti je treba podatke o telesni teži in ugotovitvah obdukcije posameznih živali. Podatke o kliničnih opažanjih je treba povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navedejo število uporabljenih živali, število živali, ki kažejo specifične znake zastrupitve, število živali, ki so bile najdene poginule med preskusom ali usmrčene iz humanih razlogov, čas smrti posameznih živali, opis in časovni potek strupenih učinkov in reverzibilnosti ter ugotovitve obdukcije.

Poročilo o preskusu

47. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije, kot je primerno:

Preskusne živali in oskrba

— opis pogojev v kletkah, vključno s številom (ali spremembo števila) živali na kletko, nastiljem, temperaturo in relativno vlažnostjo prostora, fotoperiodo ter opredelitvijo hrane,

— uporabljeno vrsta/sev in utemeljitev uporabe vrste, ki ni podgana,

— število, starost in spol živali,

— metodo randomizacije,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom hrane in virom vode),

— opis morebitne priprave živali pred preskusom, vključno s hrano, karanteno in zdravljenjem.

▼M4

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (vključno z izomerizacijo),

— identifikacijske podatke in registrsko številko Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), če je znana.

Nosilec

— utemeljitev uporabe nosilca in utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda),

— pretekle ali vzporedno pridobljene podatke, ki dokazujejo, da nosilec ne vpliva na rezultat študije.

Inhalacijska komora

— opis inhalacijske komore, vključno z merami in prostornino,

— izvor in opis opreme, uporabljene za izpostavljanje živali in ustvarjanje atmosfere,

— opremo za merjenje temperature, vlažnosti, velikosti delcev in dejanske koncentracije,

— vir zraka in obdelavo dovajanega/odvajanega zraka ter sistem za klimatiziranje,

— metode, uporabljene za umerjanje opreme za zagotavljanje homogene preskusne atmosfere,

— razliko v tlaku (pozitivna ali negativna),

— izpostavitvene odprtine na komoro (izpostavljanje nosu); položaj živali v sistemu (izpostavljanje celega telesa),

— časovno homogenost/stabilnost preskusne atmosfere,

— položaj tipal za zaznavanje temperature in vlažnosti ter mesto vzorčenja preskusne atmosfere v komori,

— stopnje pretoka zraka, stopnjo pretoka zraka/izpostavitveno odprtino (izpostavljanje nosu) ali število živali/komoro (izpostavljanje celega telesa),

— informacije o opremi, uporabljeni za merjenje kisika in ogljikovega dioksida, če se uporablja,

— čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja v inhalacijski komori (t_{95}),

— število zamenjav volumna zraka na uro,

— merilne naprave (če se uporabljajo).

Podatki o izpostavljenosti

— utemeljitev izbire ciljne koncentracije v glavni študiji,

— nazivne koncentracije (skupna masa ustvarjene preskusne kemikalije v inhalacijski komori, deljena z volumnom zraka, ki preide skozi komoro),

— dejanske koncentracije preskusne kemikalije, ki se vzamejo v območju dihanja živali, za zmesi, pri katerih nastajajo heterogene fizikalne oblike (plini, hlapi, aerosoli), se lahko vsaka analizira ločeno,

▼M4

— vse koncentracije v zraku je treba navesti v masnih enotah (npr. mg/l, mg/m^3 itd.); v oklepajih se lahko navedejo tudi prostorninske enote (npr. ppm, ppb itd.),

— porazdelitev velikosti delcev, mediano porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) in geometrični standardni odklon (σg), vključno z metodami za njihov izračun. Poročati je treba o posameznih analizah velikosti delcev.

Preskusni pogoji

— podatke o pripravi preskusne kemikalije, vključno s podrobnostmi o postopkih, uporabljenih za zmanjšanje velikosti delcev trdnih snovi ali pripravo raztopin preskusne kemikalije. Kadar obstaja možnost, da so mehanski postopki spremenili sestavo preskusne kemikalije, je treba vključiti rezultate analiz za preverjanje sestave te preskusne kemikalije,

— opis (ki po možnosti vključuje diagram) opreme, uporabljene za ustvarjanje preskusne atmosfere in izpostavljanje živali preskusni atmosferi,

— podatke o uporabljeni kemijski analitski metodi in njeni validaciji (vključno z rekuperacijo preskusne kemikalije iz nosilca za vzorčenje),

— utemeljitev določitve preskusnih koncentracij.

Rezultati

— preglednice o temperaturi, vlažnosti in pretoku zraka v komori,

— preglednice s podatki o nazivnih in dejanskih koncentracijah v komori,

— preglednice s podatki o velikosti delcev, vključno s podatki o analitskem vzorčenju, porazdelitvijo velikosti delcev ter izračuni MMAD in σ_g,

— preglednice s podatki o odzivu in koncentracijah za vsako žival (tj. za živali, ki kažejo znake zastrupitve, vključno s smrtnostjo ter naravo, resnostjo, časom nastopa in trajanjem učinkov),

— telesne teže posameznih živali, izmerjene med študijo; datum in čas smrti, če je ta nastopila pred predvideno evtanazijo; časovni potek nastopa znakov zastrupitve in ali so bili ti reverzibilni za vsako žival,

— izsledke obdukcije in histopatološke preiskave za vsako žival, če so na voljo,

— ocene smrtnosti (npr. LC_{50}, LD_{01}), vključno s 95-odstotnimi mejami zaupanja in naklonom (če tako določa ocenjevalna metoda),

— statistično povezanost, vključno z oceno eksponenta n (protokol C × t). Navesti je treba ime uporabljene statistične programske opreme.

▼**M4**

Razprava in razlaga rezultatov

— poseben poudarek je treba nameniti opisu metod, uporabljenih za izpolnitev meril te preskusne metode, npr. glede mejne koncentracije ali velikosti delcev,

— z vidika splošnih ugotovitev je treba obravnavati možnost vdihavanja delcev, zlasti če meril glede velikosti delcev ni bilo mogoče izpolniti,

— če je bilo treba na podlagi meril iz Dokumenta s smernicami OECD o humanih končnih točkah (8) humano žrtvovati živali, ki so trpele bolečine ali kazale znake hudega in trajnega trpljenja, je treba to pojasniti,

— če je bilo preskušanje na podlagi poglavja B.52 te priloge (4) prekinjeno v korist te preskusne metode B.2, je treba to utemeljiti,

— v splošno oceno študije je treba vključiti doslednost metod, uporabljenih za določanje nazivne in dejanske koncentracije, ter razmerje med njima,

— obravnavati je treba verjetni vzrok smrti in prevladujoči način delovanja (sistemski ali lokalni).

VIRI:

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(3) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

(4) Poglavje B.52 te priloge, Akutna strupenost pri vdihavanju – metoda razredov akutne strupenosti.

(5) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskus transkutane električne upornosti (TER).

(6) Poglavje B.40 bis te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskus z modelom človeške kože.

(7) OECD (2005), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

(10) Phalen, R. F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2. izdaja) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn, J. in Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

(12) Zwart, J. H. E., Arts, J. M., ten Berge, W. F., Appelman, L. M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290.

(13) Zwart, J. H. E., Arts, J. M., Klokman-Houweling, E. D., Schoen, E. D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

(14) Ten Berge, W. F. in Zwart, A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(16) Finney, D. J. (1977). Probit Analysis, 3. izdaja, Cambridge University Press, London/New York.

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

Dodatek 1

Protokol C × t

1. Postopna študija koncentracija × čas (C × t) se lahko obravnava kot alternativa tradicionalnemu protokolu, kadar se preskuša strupenost pri vdihavanju (12) (13) (14). Po možnosti jo je treba uporabljati ob posebni zakonodajni ali znanstveni potrebi po preskušanju živali v več različno dolgih časovnih obdobjih, na primer za načrtovanje odzivanja v nujnih primerih ali načrtovanje rabe tal. Ta pristop se običajno začne s preskušanjem pri mejni koncentraciji (izpostavitev I), ko se živali izpostavijo preskusni kemikaliji za pet časovnih obdobij (v trajanju npr. 15, 30, 60, 120 in 240 min), tako da se v eni izpostavitvi pridobijo podatki za več časovnih obdobij (glej sliko 1). Kadar se uporablja Uredba (ES) št. 1272/2008, so mejne koncentracije za pline, hlape in aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l oziroma 5 mg/l. Te koncentracije se smejo preseči samo ob zakonodajni ali znanstveni potrebi po preskušanju pri višjih koncentracijah (glej odstavek 37 glavnega dela poglavja B.2).

2. Kadar je informacij o strupenosti preskusne kemikalije malo oziroma jih ni, je treba opraviti opazovalno študijo, v kateri se skupine največ 3 živali na spol izpostavijo ciljnim koncentracijam, ki jih določi vodja študije, navadno za 240 min.

3. Če se med izpostavitvijo I preskusi mejna koncentracija in se opazi manj kot 50-odstotna smrtnost, dodatno preskušanje ni potrebno. Če obstaja zakonodajna ali znanstvena potreba po določitvi razmerja koncentracija/čas/odziv pri višjih koncentracijah od opredeljene mejne, je treba naslednjo izpostavitev izvesti pri višji koncentraciji, npr. dvakratniku mejne koncentracije (tj. 2L na sliki 1).

4. Če se pri mejni koncentraciji ugotovi strupenost, je potrebno dodatno preskušanje (glavna študija). To dodatno izpostavljanje se izvede bodisi pri nižjih koncentracijah (na sliki 1: izpostavitve II, III ali IV') bodisi pri višjih koncentracijah za krajša obdobja (na sliki 1: izpostavitev IV), ki so prilagojena in nekoliko manj razmaknjena.

5. Preskus (začetna in dodatne koncentracije) se opravi z 1 živaljo/spol na koncentracijo/časovno točko ali 2 živalma občutljivejšega spola na koncentracijo/časovno točko. V nekaterih okoliščinah se lahko vodja študije odloči uporabiti 2 podgani/spol na koncentracijo/časovno točko (ali 4 živali občutljivejšega spola na koncentracijo/časovno točko) (15). Uporaba 2 živali na spol na koncentracijo/časovno točko na splošno zmanjša pristranskost in spremenljivost ocen, poveča stopnjo uspešnosti ocenjevanja ter izboljša pokritost intervala zaupanja v primerjavi s protokolom, kot je opisan tukaj. Več podrobnosti je na voljo v GD 39 (2).

6. Po možnosti se vsaka izpostavitev izvede v enem dnevu. Tako se lahko z naslednjo izpostavitvijo počaka, dokler ni mogoče z razumno gotovostjo sklepati o preživetju, vodja študije pa lahko prilagodi ciljno koncentracijo in obdobja za naslednjo izpostavitev. Vsako izpostavitev je priporočljivo začeti s skupino, ki bo izpostavljena najdlje, npr. s skupino za 240-minutno izpostavljanje, tej sledi skupina za 120-minutno izpostavljanje itn. Če na primer živali v 240-minutni skupini po 90 minutah umirajo ali kažejo resne znake zastrupitve (npr. velike spremembe v vzorcu dihanja, kot je oteženo dihanje), izpostavljanje skupine za 120 minut ne bi bilo smiselno, ker bi bila smrtnost verjetno 100-odstotna. Zato mora vodja študije za zadevno koncentracijo izbrati krajša obdobja izpostavljenosti (npr. 90, 65, 45, 33 in 25 minut).

▼M4

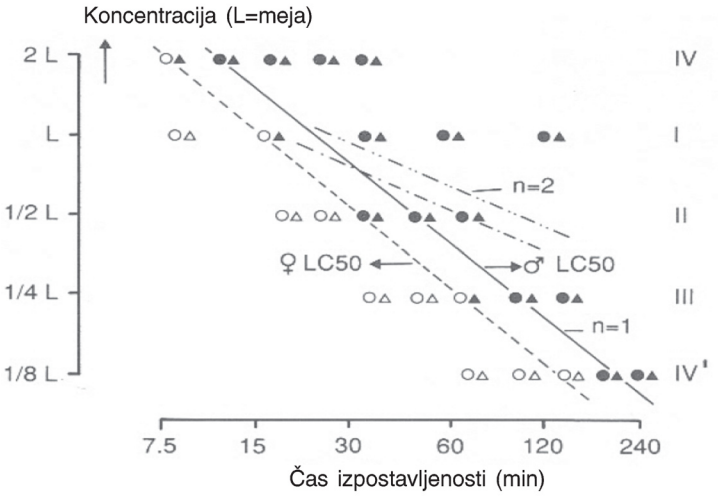
7. Koncentracijo v komori je treba pogosto meriti, da se določi časovno tehtana povprečna koncentracija za vsako obdobje izpostavljenosti. Kadar koli je to mogoče, je treba v statistični analizi uporabiti čas smrti za vsako žival (namesto obdobja izpostavljenosti).

8. Rezultate prvih štirih izpostavitev je treba preučiti, da se opredeli podatkovna vrzel v krivulji koncentracija-čas (glej sliko 1). V primeru nezadostnega ujemanja se lahko izvede dodatna izpostavitev (5. koncentracija). Koncentracijo in obdobja izpostavljenosti za 5. izpostavitev je treba izbrati tako, da se zapolni ta vrzel.

9. Vse izpostavitve (vključno s prvo) se uporabijo za izračun razmerja koncentracija-čas-odziv s statistično analizo (16). Če je to mogoče, je treba za vsak interval C × t uporabiti časovno tehtano povprečno koncentracijo in obdobje izpostavljenosti do smrti (če ta nastopi med izpostavljenostjo).

Slika 1

Hipotetični prikaz razmerja koncentracija-čas-smrtnost pri podganah



Prazni simboli = preživele živali; polni simboli = poginule živali

Trikotniki = samice; krožci = samci

Neprekinjena črta = vrednosti LC_{50} (razpon 7,5–240 min) za samce pri n = 1

Črtkana črta = vrednosti LC_{50} (razpon 7,5–240 min) za samice pri n = 1

Pikčasta črta = hipotetične vrednosti LC_{50} za samce in samice, če bi veljalo n = 2 (12)

Glosar

Koncentracija:

Čas izpostavljenosti:

▼M4

10. V nadaljevanju je predstavljen primer postopnega postopka:

Izpostavitev I – preskušanje pri mejni koncentraciji (glej sliko 1)

— 1 žival/spol na koncentracijo/časovno točko; skupno 10 živali ([a])

— Ciljna koncentracija ([b]) = mejna koncentracija.

— Pet skupin živali se tej ciljni koncentraciji izpostavi za 15, 30, 60, 120 oziroma 240 minut.

↓

Izpostavitev II ([c]) – glavna študija

— 1 žival/spol na koncentracijo/časovno točko; skupno 10 živali.

— Pet skupin živali se izpostavi nižji koncentraciji ([d]) (1/2 L) z malce daljšimi obdobji izpostavljenosti (razmaknjenimi glede na faktor √2; glej sliko 1).

↓

Izpostavitev III – glavna študija

— 1 žival/spol na koncentracijo/časovno točko; skupno 10 živali.

— Pet skupin živali se izpostavi nižji koncentraciji ([d]) (1/4 L) z malce daljšimi obdobji izpostavljenosti (razmaknjenimi glede na faktor √2; glej sliko 1).

↓

Izpostavitev IV' – glavna študija

— 1 žival/spol na koncentracijo/časovno točko; skupno 10 živali.

— Pet skupin živali se izpostavi nižji koncentraciji ([d]) (1/8 L) z malce daljšimi obdobji izpostavljenosti (razmaknjenimi glede na faktor √2; glej sliko 1).

↓ ali

([a]) Če informacije o občutljivosti glede na spol niso na voljo, se uporabijo podgane obeh spolov, tj. 1 žival/spol na koncentracijo. Na podlagi obstoječih informacij ali če se med to izpostavitvijo izkaže, da je en spol občutljivejši, se v nadaljnjem preskušanju uporabi 10 živali občutljivejšega spola (2 živali na koncentracijo/časovno točko) pri vsaki koncentraciji.

([b]) Kadar se uporablja Uredba (ES) št. 1272/2008, so mejne koncentracije za pline, hlape in aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l oziroma 5 mg/l. Nižje začetne koncentracije je treba izbrati, če se pričakuje strupenost ali na podlagi rezultatov opazovalne študije. V primeru zakonodajnih ali znanstvenih potreb se lahko uporabijo višje koncentracije.

([c]) Po možnosti je treba z izpostavljanjem živali naslednji ravni koncentracije počakati, dokler ni mogoče z razumno gotovostjo sklepati o preživetju predhodno tretiranih živali. Tako lahko vodja študije prilagodi ciljno koncentracijo in obdobja za naslednjo izpostavitev.

([d]) Minimalni odmerek (koncentracija × čas), ki je povzročil smrtnost med preskušanjem pri začetni koncentraciji (prva izpostavitev), se upošteva kot smernica za določitev naslednje kombinacije koncentracije in obdobij izpostavljenosti. Običajno se koncentracija prepolovi (1/2 L), živali pa se izpostavijo v novem časovnem razponu z drobnejšo mrežo, ki vključuje geometrično razporeditev obdobij izpostavljenosti glede na faktor 1,4 (√2; glej vir (11)) okoli časa v skladu z minimalno smrtno velikostjo odmerka (čas × koncentracija), opaženo pri prvi izpostavitvi. Na zgornji sliki (slika 1) je bila smrtnost pri izpostavitvi I najprej opažena pri 15 min, zato se obdobja v izpostavitvi II razporedijo okoli 30 min, tako da znašajo 15, 21, 30, 42 in 60 min. Po prvih dveh izpostavitvah se močno priporoča, da se podatki prikažejo v podobnem diagramu, kot je prikazan na zgornji sliki, ter da se preveri, ali ima razmerje med koncentracijo in časom kót 45 stopinj (n = 1) oziroma ali je razmerje koncentracija-čas-odziv manj strmo (npr. n = 2) oziroma strmejše (npr. n = 0,8). V zadnjih dveh primerih se močno priporoča, naj se naslednje koncentracije in obdobja ustrezno prilagodijo.

▼M4

Izpostavitev IV – glavna študija

— 1 žival/spol na koncentracijo/časovno točko; skupno 10 živali.

— Pet skupin živali se izpostavi višji koncentraciji ([e]) (2 L) z malce krajšimi obdobji izpostavljenosti (razmaknjenimi glede na faktor √2; glej sliko 1).

Matematična obdelava rezultatov za protokol C × t

11. Postopek C × t, ki zajema 4 ali 5 koncentracij izpostavljenosti in pet obdobij, da 20 oziroma 25 podatkovnih točk. S temi podatkovnimi točkami se lahko razmerje C × t izračuna s statistično analizo (16):

Enačba 1

$$Verjetnost(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

kjer je C = koncentracija; t = obdobje izpostavljenosti, ali

Enačba 2

$$Odziv = f(C^n t)$$

kjer je $n = b_1/b_2$.

Z enačbo 1 se lahko izračuna vrednost LC_{50} za dano časovno obdobje (npr. 4 ure, 1 uro, 30 minut ali katero koli časovno obdobje v razponu preskuševanih časovnih obdobij) z uporabo P = 5 (50-odstotni odziv). Opozoriti je treba, da Haberjevo pravilo velja samo, kadar je n = 1. Vrednost LC_{01} se lahko izračuna z uporabo P = 2,67.

([e]) V nekaterih primerih je morda treba povečati koncentracijo (2 L) v novem časovnem razponu s še drobnejšo mrežo, ki vključuje geometrično razporeditev obdobij izpostavljenosti glede na faktor 1,4 (√2) okoli časa v skladu z minimalno smrtno koncentracijo, opaženo v prvi izpostavitvi. Po možnosti mora biti najkrajše obdobje izpostavljenosti daljše od 5 minut, najdaljše obdobje izpostavljenosti pa ne sme presegati 8 ur.;

▼B

B.3 **AKUTNA STRUPENOST (V STIKU S KOŽO)**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod dela B (A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod dela B (B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se nanese na kožo v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, pri čemer se uporabi en odmerek na skupino. Nato se opazujejo učinki in smrtnost. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

Živali, ki kažejo hude in dolgotrajne znake stresa in bolečine, bo morda treba humano usmrtiti. Odmerjanja preskusnih snovi na način, za katerega je znano, da povzroča izrazito bolečino in stres zaradi jedkih ali dražilnih lastnosti, ni treba izvesti.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih kletkah v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade odrasle živali naključno izberejo in dodelijo tretiranim skupinam. Približno 24 ur pred preskusom je treba živalim s hrbtnega dela trupa s striženjem ali britjem odstraniti dlako. Med striženjem ali britjem dlake je treba paziti, da se koža ne odrgne, kar bi lahko spremenilo njeno prepustnost. Za nanos preskusne snovi je treba pripraviti najmanj 10 % telesne površine. Pri preskušanju trdnih snovi, ki se po potrebi lahko uprašijo, je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Pri uporabi nosilca je treba upoštevati njegov vpliv na prodiranje preskusne snovi skozi kožo. Tekoče preskusne snovi se običajno uporabljajo nerazredčene.

1.6.2 **Preskusni pogoji**

1.6.2.1 *Poskusne živali*

Uporabi se lahko odrasla podgana ali kunec. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, vendar je treba njihovo uporabo utemeljiti. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve. Ob začetku preskusa pri nobenem spolu območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti.

▼B

1.6.2.2 *Število in spol*

Na vsako velikost odmerka se uporabi najmanj 5 živali. Vse morajo biti istega spola. Če se uporabijo samice, morajo biti nulipare in nebreje. Kadar so na voljo informacije, da je eden od spolov izrazito občutljivejši, je treba snov odmeriti živalim tega spola.

Opomba: Pri preskusih akutne strupenosti na živalih iz sistematskih skupin, višjih od glodavcev, je treba razmisliti o uporabi manjšega števila živali. Odmerke je treba skrbno izbrati in treba si je čim bolj prizadevati, da se ne presežejo zmerno strupeni odmerki. Pri takih preskusih se je treba izogibati dajanju smrtnih odmerkov preskusne snovi.

1.6.2.3 *Velikost odmerkov*

Teh mora biti dovolj, najmanj tri, in biti morajo v primernih intervalih koncentracij, da pri preskusnih skupinah povzročijo niz različnih strupenih učinkov in stopenj umrljivosti. Pri določanju velikosti odmerkov je treba upoštevati vse dražilne ali jedke učinke. Podatki morajo zadoščati za izdelavo krivulje odmerek/odziv in, kadar je mogoče, omogočiti sprejemljivo določitev LD_{50}.

1.6.2.4 *Mejni preskus*

Lahko se izvede mejni preskus pri eni velikosti odmerka najmanj 2 000 mg/kg telesne mase na skupini 5 samcev in 5 samic po spodaj opisanem postopku. Če se pojavi smrtnost, povezana s snovjo, bo morda potrebna popolna študija.

1.6.2.5 *Obdobje opazovanja*

Obdobje opazovanja mora trajati najmanj 14 dni. Vendar trajanje opazovanja ne sme biti strogo določeno. Določeno mora biti na podlagi reakcij na strupenost, hitrosti njihovega pojavljanja in dolžine obdobja okrevanja; kadar se zdi potrebno, se lahko podaljša. Čas pojava in izginotja znakov strupenosti, njihovo trajanje ter čas smrti so pomembni, zlasti če se kaže težnja časovnega zamika smrti.

1.6.3 **Postopek**

Vsaka žival mora biti v svoji kletki. Preskusno snov je treba enakomerno nanesti na območje, ki predstavlja približno 10 % skupne telesne površine. Pri zelo strupenih snoveh je lahko površina nanosa manjša, vendar mora biti čim več površine pokrite s čim tanjšo in enakomerno plastjo.

Snov mora ostati v stiku s kožo celo 24-urno obdobje izpostavljenosti, kar se zagotovi s poroznim gaznim povojem in nedražilnim obližem. Preskusna površina mora biti dodatno ustrezno pokrita, da gazni povoj in preskusna snov ostaneta na istem mestu in se živalim prepreči zaužitje preskusne snovi. Za preprečitev zaužitja se lahko uporabijo pripomočki za omejevanje gibanja, vendar popolna imobilizacija ni priporočena metoda.

▼B

Ob koncu obdobja izpostavljenosti se ostanek preskusne snovi odstrani, kadar je to izvedljivo, z vodo ali kako drugo ustrezno metodo čiščenja kože.

Opazovanja se beležijo sistematično in sproti. Za vsako žival je treba voditi svojo evidenco. Prvi dan morajo biti opazovanja pogosta. Najmanj enkrat na vsak delavnik je treba izvesti temeljit klinični pregled, druga opazovanja pa se izvajajo vsak dan, z ustreznimi ukrepi za zmanjševanje izgube živali v študiji, npr. z obdukcijo ali ohladitvijo poginulih živali in osamitvijo ali žrtvovanjem šibkih ali umirajočih živali.

Opazovati je treba spremembe na kožuhu, tretirani koži, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. S posebno pozornostjo je treba opazovati tremor, krče, slinjenje, diarejo, letargijo, spanje in komo. Čas smrti je treba zapisati kolikor je mogoče natančno. Na živalih, ki poginejo med preskušanjem, in tistih, preživelih ob koncu preskusa, se opravi obdukcija. Zapisati je treba vse makroskopske patološke spremembe. Kadar je tako navedeno, je treba vzeti vzorec tkiva za histopatološko preiskavo.

Ocena strupenosti pri drugem spolu

Po zaključku študije na enem spolu, se snov odmeri najmanj eni skupini 5 živali drugega spola, da se ugotovi, ali so živali tega spola izrazito občutljivejše za preskusno snov. V posameznih primerih je upravičena uporaba manjšega števila živali. Kadar so na voljo zadovoljive informacije, ki kažejo, da so živali preskušenega spola izrazito občutljivejše, preskušanje živali drugega spola ni potrebno.

2. **PODATKI**

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, čas smrti posameznih živali, število živali, ki kažejo druge znake strupenosti, opis strupenih učinkov in izsledke obdukcije. Maso posameznih živali je treba določiti in zapisati tik pred nanašanjem preskusne snovi, vsak teden po tem ter ob smrti; spremembe v masi je treba izračunati in zapisati, kadar preskusna žival preživi več kakor en dan. Živali, ki se humano usmrtijo zaradi s snovjo povezanih stresa in bolečine, se zapišejo kot s snovjo povezane smrti. LD_{50} je treba določiti s pomočjo priznane metode.

Vrednotenje podatkov mora vključevati vrednotenje morebitnih razmerij med izpostavljenostjo živali preskusni snovi ter incidenco in resnostjo vseh nepravilnosti, vključno z vedenjskimi in kliničnimi nepravilnostmi, hujšimi poškodbami, spremembami v telesni masi, smrtnostjo in kakršnimi koli drugimi strupenimi učinki.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

▼B

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.,

— preskusni pogoji (vključno z metodo čiščenja kože in vrsto povoja: okluzivni ali neokluzivni),

— velikost odmerkov (z nosilcem, če se uporablja, in koncentracijami),

— spol živali, ki so prejele preskusno snov,

— tabelarni prikaz podatkov o odzivu po spolu in velikosti odmerka (tj. število živali, ki so poginile ali so bile usmrčene med preskusom; število živali, ki kažejo znake strupenosti; število izpostavljenih živali),

— čas smrti po odmerjanju, razlogi in merila za humano usmrtitev živali,

— vsa opažanja,

— vrednost LD_{50} za spol, na katerem je bila opravljena popolna študija, določena po 14 dneh z navedeno metodo določanja,

— 95 % interval zaupanja za LD_{50} (kadar je to mogoče),

— krivulja odmerek/smrtnost in naklon, kadar to omogoča metoda določanja,

— izsledki obdukcije,

— kakršni koli izsledki histopatoloških preiskav,

— rezultati kakršnih koli preskusov na drugem spolu,

— razprava o rezultatih (posebno pozornost je treba posvetiti morebitnemu učinku humanih usmrtitev živali med preskusom na izračunano vrednost LD_{50}),

— razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod dela B (D).

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B (E).

▼M8

B.4 AKUTNO DRAŽENJE KOŽE/JEDKOST ZA KOŽO

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 404 (2015). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno preverjajo, s čimer se zagotovi, da izražajo najboljša razpoložljiva znanstvena spoznanja. Pri preverjanju Smernice OECD za preskušanje 404 je bila posebna pozornost namenjena možnim izboljšavam v zvezi s pomisleki glede dobrobiti živali in ocenjevanju vseh obstoječih podatkov o preskusni kemikaliji, da bi se izognili nepotrebnim testiranjem na laboratorijskih živalih. Posodobljena različica Smernice OECD za preskušanje 404 (prvotno sprejeta leta 1981, revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) vključuje sklic na dokument s smernicami za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)) v zvezi z draženjem kože/jedkostjo za kožo (1), pri čemer je predlagan modularen pristop k preskušanju draženja kože in jedkosti za kožo. S pristopi IATA se opisuje več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, ter (i) zagotavljajo smernice o tem, kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, poleg tega je (ii) predlagan pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (1). Poleg tega je v navedeni smernici, kjer je to potrebno, namesto sočasne priporočena zaporedna namestitev treh preskusnih obližev na žival v začetnem preskusu *in vivo*.

2. Opredelitvi pojmov draženje kože in jedkost za kožo sta navedeni v dodatku k tej preskusni metodi.

ZAČETNI PREUDARKI

3. Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali je koristno, da se preskusi *in vivo* začnejo izvajati šele, ko se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, kot je predstavljena v dokumentu s smernicami za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju v zvezi z draženjem kože in jedkostjo za kožo, tj. v vseh treh delih teh smernic in njihovih ustreznih modulih (1), ocenijo vsi razpoložljivi podatki, ki se nanašajo na potencial preskusne kemikalije za draženje kože/jedkost za kožo. Na kratko, v prvem delu se obstoječi podatki obravnavajo na podlagi sedmih modulov, ki zajemajo podatke za ljudi, podatke *in vivo*, podatke *in vitro*, podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih (npr. vrednost pH, zlasti močna kislost ali alkalnost) in nepreskusne metode. V drugem delu se opravi analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Če ta analiza še vedno ni prepričljiva, je treba tretji del izvesti z dodatnim preskušanjem, pri čemer se začne z metodami *in vitro*, preskušanje *in vivo* pa se uporabi kot zadnja možnost. S to analizo bi se morala torej zmanjšati potreba po *in vivo* preskušanju jedkosti za kožo/draženja kože v zvezi s preskusnimi kemikalijami, za katere je glede navedenih dveh končnih točk na voljo že dovolj dokazov iz drugih študij.

NAČELO PRESKUSA IN VIVO

4. Preskusna kemikalija, ki jo je treba preskusiti, se nanese na kožo preskusne živali v enkratnem odmerku; netretirane površine kože preskusne živali služijo za kontrolo. Stopnja dražilnosti/jedkosti se odčita in evidentira v določenih intervalih in nadalje opiše, da se vsi učinki celovito ocenijo. Študija mora trajati dovolj dolgo, da se oceni popravljivost ali nepopravljivost opaženih učinkov.

▼M8

5. Živali, ki v kateri koli fazi preskusa kažejo trajne znake hudega trpljenja in/ali bolečine, je treba humano usmrtiti, preskusno kemikalijo pa oceniti skladno s tem. Merila za sprejetje odločitve o humani usmrtitvi umirajočih in hudo trpečih živali so navedena v ločenem dokumentu s smernicami (2).

PRIPRAVA ZA PRESKUS IN VIVO

Izbira živalskih vrst

6. Kunec beličnik je najbolj zaželena laboratorijska žival; uporabljajo se zdravi mladi odrasli kunci. Uporabo drugih vrst je treba obrazložiti.

Priprava živali

7. Približno 24 ur pred začetkom preskusa je treba živalim skrbno ostriči dlako s hrbtnega dela trupa. Paziti je treba, da se koža ne odrgne, in uporabiti le živali z zdravo, nepoškodovano kožo.

8. Nekateri kunčji sevi imajo goste zaplate dlak, ki so bolj izrazite v nekaterih obdobjih med letom. Takšni predeli goste rasti dlak se ne smejo uporabiti kot preskusni predeli.

Pogoji nastanitve in hranjenja

9. Živali morajo biti nastanjene posamično. Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi mora biti za kunce 20 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporabi običajna predpisana laboratorijska prehrana z neomejeno količino pitne vode.

PRESKUSNI POSTOPEK

Nanašanje preskusne kemikalije

10. Preskusno kemikalijo je treba nanesti na del površine kože (približno 6 cm^2) in pokriti z obližem iz gaze, ki se pritrdi z nedražilnim trakom. Kadar neposredna aplikacija ni mogoča (npr. tekoče snovi ali nekatere kašnate zmesi), je treba preskusno kemikalijo najprej nanesti na obliž iz gaze, ki se nato uporabi na koži. Obliž mora biti v ohlapnem stiku s kožo, pritrjen z ustrezno napol zapiralno obvezo med trajanjem izpostavitve. Če se preskusna kemikalija nanese na obliž, jo je treba pritrditi na kožo tako, da je stik dober in preskusna kemikalija enakomerno razporejena po koži. Živali je treba preprečiti dostop do obliža in zaužitje ali vdihavanje preskusne kemikalije.

11. Tekoče preskusne kemikalije se običajno uporabljajo nerazredčene. Kadar se preskušajo trdne snovi (ki jih je mogoče zdrobiti, če je to po presoji potrebno), je treba preskusno kemikalijo navlažiti z zelo majhno količino vode (ali, kadar je potrebno, z drugim ustreznim vehiklom), ki zadostuje za zagotavljanje dobrega stika s kožo. Kadar se uporabljajo drugi vehikli, ne voda, mora biti možen vpliv vehikla na dražilnost kože zaradi preskusne kemikalije minimalen, če sploh obstaja.

12. Na koncu obdobja izpostavljenosti, ki traja običajno 4 ure, je treba z uporabo vode ali ustreznega topila odstraniti preostalo preskusno kemikalijo, kjer je to izvedljivo, ne da bi se spremenil obstoječi odziv ali integriteta epidermisa.

▼M8

Velikost odmerka

13. Na preskusni predel se nanese odmerek 0,5 ml tekoče snovi ali 0,5 g trdne snovi ali kašnate zmesi.

Začetni preskus (*in vivo* preskus draženja kože/jedkosti za kožo z uporabo ene živali)

14. Kadar se presodi, da je preskusna kemikalija jedka, dražilna ali nerazvrščena, na podlagi analiz, ki temeljijo na zanesljivosti dokazov, ali predhodnega preskušanja *in vitro*, običajno ni potrebno dodatno preskušanje *in vivo*. Kadar se kljub temu zdi potrebno zagotoviti dodatne podatke, se izvede preskus *in vivo* z uporabo ene živali in na podlagi naslednjega pristopa. Na žival se zaporedoma nanesejo do trije preskusni obliži. Prvi obliž se odstrani po treh minutah. Če ni opažena nobena resna reakcija kože, se na drug predel nanese drugi obliž in se odstrani po eni uri. Če opazovanja v tej fazi pokažejo, da se lahko humano dopusti podaljšanje izpostavljenosti na štiri ure, se nanese še tretji obliž in se odstrani po štirih urah, odziv pa se razvrsti po stopnjah.

15. Če se opazi jedek učinek po kateri koli izmed teh treh zaporednih izpostavitev, se preskus nemudoma zaključi. Če se jedek učinek ne opazi po tem, ko se odstrani zadnji obliž, se žival opazuje 14 dni, razen če se jedkost razvije prej.

16. Kadar se ne pričakuje, da bo preskusna kemikalija povzročila jedkost, vendar bi lahko bila dražilna, je treba nanesti le en obliž na eno žival za štiri ure.

Potrditveni preskus (*in vivo* preskus draženja kože z dodatnimi živalmi)

17. Če se jedek učinek v začetnem preskusu ne opazi, je treba dražilni ali negativni odziv potrditi z uporabo do dveh dodatnih živali, s po enim obližem za vsako, v obdobju izpostavitve štirih ur. Če se v začetnem preskusu opazi dražilen učinek, se potrditveni preskus lahko izvede zaporedoma ali s sočasno izpostavitvijo dveh dodatnih živali. Izjemoma, ko se začetni preskus ne izvede, se lahko dve ali tri živali tretirajo le z enim obližem, ki se odstrani po štirih urah. Kadar se uporabljata dve živali, ni potrebno dodatno preskušanje, če obe kažeta enak odziv. V nasprotnem primeru se preskusi tudi tretja žival. Dvoumne odzive je morda treba oceniti z uporabo dodatnih živali.

Obdobje opazovanja

18. Obdobje opazovanja mora biti dovolj dolgo, da se lahko v celoti ovrednoti popravljivost opaženih učinkov. Preskus je treba zaključiti, kadar koli žival pokaže znake hude bolečine ali trpljenja. Za določitev povračljivosti učinkov je treba živali opazovati 14 dni po odstranitvi obližev. Če se povračljivost opazi pred 14. dnem, je treba preskus zaključiti takrat.

Klinična opazovanja in razvrščanje kožnih reakcij v stopnje

19. Pri vseh živalih je treba preveriti znake rdečine in edemov ter odzive evidentirati po 60 minutah ter nato po 24, 48 in 72 urah po odstranitvi obliža. Pri začetnih preskusih na eni živali se preskusni predel preveri tudi takoj po odstranitvi obliža. Kožne reakcije se razvrstijo v stopnje in evidentirajo v skladu s stopnjami iz spodnje tabele. Če po 72 urah nastane poškodba kože, ki je ni mogoče opredeliti kot dražilnost ali jedkost, so morda potrebna

▼M8

opazovanja do 14. dne, da se opredeli povračljivost učinkov. Poleg opazovanja dražilnosti je treba v celoti opisati in evidentirati vse lokalne toksične učinke, npr. tanjšanje kože, in vse sistemske nasprotne učinke (npr. učinke na klinične znake toksičnosti in telesno težo). Za razjasnitev dvoumnih odzivov je morda treba opraviti histopatološki pregled.

20. Razvrščanje kožnih odzivov je nujno subjektivno. Da bi se izboljšala usklajenost pri določanju stopnje kožnega odziva ter bi se preskuševalnim laboratorijem in vsem sodelujočim pomagalo pri oblikovanju in razlagi rezultatov opazovanj, mora biti osebje, ki izvaja ta opazovanja, ustrezno usposobljeno za uporabo sistema določanja stopnje (glej tabelo spodaj). Pri tem bi lahko bil v pomoč ilustriran priročnik za določanje stopnje dražilnosti kože in drugih lezij (3).

PODATKI IN POROČANJE

21. Rezultate študije je treba v obliki preglednice povzeti v končnem poročilu o preskusu, zajemati pa morajo vse postavke s seznama v odstavku 24.

Vrednotenje rezultatov

22. Rezultate draženja kože je treba vrednotiti v povezavi z vrsto in resnostjo lezij ter njihovo povračljivostjo ali nepovračljivostjo. Posamezni rezultati ne pomenijo absolutnega standarda za dražilne lastnosti materiala, ker se ocenjujejo tudi drugi učinki preskusnega materiala. Pač pa je treba posamezne rezultate obravnavati kot referenčne vrednosti, ki jih je treba vrednotiti v povezavi z vsemi drugimi opažanji iz študije.

23. Pri oceni dražilnih odzivov je treba upoštevati povračljivost kožnih lezij. Kadar so odzivi, npr. alopecija (omejen predel), hiperkeratoza, hiperplazija in luščenje, vidni do konca 14-dnevnega obdobja opazovanja, je treba preskusno kemikalijo obravnavati kot dražilno.

Poročilo o preskusu

24. Poročilo o preskusu mora vsebovati informacije, navedene v nadaljevanju.

Utemeljitev preskusa in vivo:

— analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov in se nanaša na obstoječe preskusne podatke, vključno z rezultati strategije zaporednega preskušanja;

— opis pomembnih podatkov, ki so na voljo iz prejšnjih preskušanj;

— podatki, pridobljeni v vsaki fazi strategije preskušanja;

— opis izvedenih preskusov *in vitro*, vključno s podrobnimi podatki o postopkih, rezultati, dobljenimi s preskusnimi/referenčnimi snovmi;

— analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za izvedbo študije *in vivo*.

Preskusna kemikalija:

— snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

▼**M8**

— snov z več sestavinami, zmes in snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB): čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— vir, številka serije, če je na voljo;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;

— pogoji skladiščenja.

Vehikel:

— identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljena količina;

— utemeljitev izbire vehikla.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev, obrazložitev za uporabo živali, če to ni kunec beličnik;

— število živali po spolu;

— teža posamezne živali ob začetku in zaključku preskusa;

— starost na začetku študije;

— izvor živali, nastanitvene razmere, prehrana itd.

Preskusni pogoji:

— tehnika priprave območja nanosa obliža;

— podrobnosti o uporabljenih materialih ter tehniki priprave in nanosa obliža,

— podrobnosti o pripravi, nanosu in odstranitvi preskusne kemikalije.

Rezultati:

— preglednica doseženih rezultatov odziva na dražilnost/jedkost za vsako žival na vseh izmerjenih časovnih točkah;

— opis vseh opaženih lezij;

— podroben opis vrste in stopnje opažene dražilnosti ali jedkosti in morebitne histopatološke ugotovitve;

— opis drugih neželenih lokalnih (npr. tanjšanje kože) in sistemskih učinkov poleg dražilnosti kože ali jedkosti za kožo.

▼**M8**

Obravnava rezultatov

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) OECD (1998). Usklajen celostni sistem razvrstitve kemijskih snovi glede na nevarnosti za zdravje ljudi in vplive na okolje, kot sta ga novembra 1998 na 28. skupnem zasedanju potrdila Odbor za kemikalije in Delovna skupine za kemikalije.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼**M8**

Preglednica

RAzvrščanje Kožnih Reakcij v Stopnje

Nastanek rdečine in krast

Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2
Zmerna do resna rdečina	3
Resna rdečina (goveja rdečina) in nastanek krast, ki ovira razvrstitev rdečine	4

Najvišja možna stopnja: 4

Tvorba kožnih edemov

Kožnih edemov ni	0
Neznaten kožni edem (komajda opazen)	1
Rahel edem (robovi predela dobro vidni, ker so izbočeni)	2
Zmeren kožni edem (izbočen približno 1 mm)	3
Resen kožni edem (izbočen več kakor 1 mm in razširjen zunaj predela izpostavitve)	4

Najvišja možna stopnja: 4

Za razjasnitev dvoumnih odzivov se lahko opravi histopatološki pregled.

▼**M8**

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija je snov ali zmes.

Draženje kože je nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure.

Jedkost za kožo je nastanek nepovračljivih poškodb kože, zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M7

B.5 AKUTNO DRAŽENJE OČI/JEDKOST ZA OČI

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 405 (2012). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno preverjajo, s čimer se zagotovi, da izražajo najboljša razpoložljiva znanstvena spoznanja. Pri prejšnjih preverjanjih te smernice za preskušanje je bila posebna pozornost namenjena možnim izboljšavam z ocenjevanjem vseh obstoječih podatkov o preskusni kemikaliji, da bi se izognili nepotrebnim testiranjem na živalih v laboratoriju in tako obravnavali pomisleke glede dobrobiti živali. V smernico TG 405 (sprejeto leta 1981 ter posodobljeno v letih 1987, 2002 in 2012) je vključeno priporočilo, da je treba pred začetkom izvajanja opisanega preskusa akutnega draženja oči/jedkosti za oči *in vivo* izvesti analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov (1), na podlagi ustreznih obstoječih podatkov. Kadar ni na voljo dovolj podatkov, je priporočljivo, da se pridobijo z uporabo zaporednega preskušanja (2) (3). Strategija preskušanja vključuje izvajanje validiranih in sprejetih preskusov *in vitro* ter se zagotovi kot dodatek k tej preskusni metodi. Celovita strategija preskušanja je za namen Uredbe (ES) št. 1907/2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ([1]) vključena tudi v ustrezne smernice agencije ECHA (21). Testiranja na živalih je treba izvesti šele, če se po proučitvi razpoložljivih alternativnih metod ugotovi, da so nujni in da je uporaba navedenih metod primerna. Ob pripravi te posodobljene preskusne metode se pojavljajo primeri, ko je njena uporaba še vedno potrebna ali se zahteva v skladu z nekaterimi regulativnimi okviri.

Zadnja posodobitev je bila v glavnem usmerjena na uporabo analgetikov in anestetikov ter ni vplivala na osnovni koncept in strukturo smernice za preskušanje. ICCVAM ([2]) in neodvisna mednarodna znanstvena strokovna skupina za ocenjevanje sta pregledala uporabnost in omejitve redne uporabe topičnih anestetikov, sistemskih analgetikov in humanih končnih točk med oceno varnosti draženja oči *in vivo* (12). V pregledu sta ugotovila, da bi se z uporabo topičnih anestetikov in sistemskih analgetikov lahko izognili večini bolečine in trpljenja ali vsej bolečini in trpljenju, ne da bi to vplivalo na rezultate poskusa, ter priporočila, da bi bilo treba te snovi vedno uporabljati. Pri tej preskusni metodi se upošteva ta pregled. Med preskušanjem akutnega draženja oči in jedkosti za oči *in vivo* bi bilo treba redno uporabljati topične anestetike, sistemske analgetike in humane končne točke. Izjeme glede njihove uporabe bi bilo treba utemeljiti. Z izboljšanji, opisanimi v tej metodi, se bosta v večini primerov preskušanja, pri katerih je še vedno potrebno *in vivo* preskušanje varnosti za oči, bolečina in trpljenje živali znatno zmanjšala ali se bo bolečini in trpljenju živali mogoče izogniti.

Uravnoteženo vnaprejšnje lajšanje bolečin bi moralo vključevati (i) redno dajanje topičnih anestetikov (npr. proparakain ali tetrakain) in sistemskih analgetikov (npr. buprenorfin) pred preskušanjem, (ii) redni program dajanja sistemskih analgetikov po tretiranju (npr. buprenorfin in meloksikam), (iii) načrt opazovanja, spremljanja in evidentiranja živali za odkrivanje kliničnih znakov bolečine in/ali trpljenja ter (iv) načrt opazovanja, spremljanja in evidentiranja narave, resnosti in napredovanja poškodb oči. Nadaljnje podrobnosti so navedene v posodobljenih

([1]) Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES. UL L 304, 22.11.2007, str. 1.

([2]) Medagencijski usklajevalni odbor ZDA za validacijo alternativnih metod.

▼M7

postopkih v nadaljevanju. Po dajanju preskusne kemikalije se ne smejo uporabiti nobeni dodatni topični anestetiki ali analgetiki, da ne bi prihajalo do motenja študije. Protivnetni analgetiki (npr. meloksikam) se ne smejo nanašati topično, sistemsko uporabljeni odmerki pa ne smejo vplivati na učinke na oči.

Opredelitve so navedene v dodatku k preskusni metodi.

ZAČETNI PREUDARKI

Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali je koristno, da se preskusi *in vivo* začnejo izvajati šele, ko se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ocenijo vsi razpoložljivi podatki, ki se nanašajo na potencial kemikalije za draženje oči/jedkost za oči. V take podatke so vključeni dokazi iz obstoječih študij na ljudeh in/ali laboratorijskih živalih, dokazi o draženju oči/jedkosti za oči ene ali več strukturno sorodnih snovi ali mešanic takih snovi, podatki, ki kažejo visoko kislost ali alkalnost kemikalije (4) (5), ter rezultati iz potrjenih in sprejetih preskusov jedkosti za kožo in jedkosti za oči/draženje oči *in vitro* ali *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Študije se lahko izvedejo pred analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ali kot posledica take analize.

S tako analizo se lahko pri nekaterih kemikalijah nakaže potreba po *in vivo* študijah potenciala kemikalije za jedkost za oči/draženje oči. V vseh takih primerih je treba pred proučitvijo uporabe očesne študije *in vivo* po možnosti najprej izvesti študijo *in vitro* in/ali *in vivo* učinkov jedkosti za kožo, ki jih ima kemikalija, ter jih oceniti v skladu s strategijo zaporednega preskušanja s preskusno metodo B.4 (7) ali celovito strategijo preskušanja, opisano v smernicah agencije ECHA (21).

Strategija zaporednega preskušanja, v katero so vključeni potrjeni preskusi *in vitro* ali *ex vivo* jedkosti za oči/draženja oči, je k tej preskusni metodi vključena kot dodatek, za namen uredbe REACH pa v smernice agencije ECHA (21). Priporočljivo je, da se ta strategija preskušanja upošteva pred izvedbo preskusa *in vivo*. Za nove kemikalije je priporočljivo, da se znanstveno zanesljivi podatki o jedkosti/draženju kemikalije pridobijo s postopnim načinom preskušanja. Za obstoječe kemikalije, za katere ni na voljo dovolj podatkov o jedkosti za kožo in oči/draženju kože in oči, se lahko s to strategijo zapolnijo vrzeli v podatkih. Uporabo drugačne strategije ali postopka preskušanja ali odločitev o tem, da se ne bo uporabil postopen način preskušanja, je treba utemeljiti.

NAČELO PRESKUSA *IN VIVO*

Po predhodnem tretiranju s sistemskimi analgetiki in nanosu ustreznih topičnih anestetikov se kemikalija, ki jo je treba preskusiti, v enkratnem odmerku nanese na eno oko poskusne živali; netretirano oko se uporablja za kontrolo. Stopnja dražilnosti/jedkosti za oči se oceni s seštevanjem lezij na očesni veznici, roženici in šarenici, v točno določenih intervalih. Drugi učinki na oko in škodljivi sistemski učinki se prav tako opišejo, da se vsi učinki celovito ocenijo. Študija mora trajati dovolj dolgo, da se oceni popravljivost ali nepopravljivost učinkov.

Živali, ki kažejo znake hudega trpljenja in/ali bolečine v kateri koli fazi poskusa ali imajo lezije, skladne s humanimi končnimi točkami, opisanimi v tej preskusni metodi (glej odstavek 26), je treba humano usmrtiti in kemikalijo skladno s tem oceniti. Merila za sprejem odločitve o humani usmrtitvi umirajočih in hudo trpečih živali so navedena v dokumentu s smernicami OECD (8).

▼M7

PRIPRAVA ZA PRESKUS *IN VIVO*

Izbira vrst

Kunec beličnik je najbolj zaželena laboratorijska žival in uporabljajo se zdrave mlade odrasle živali. Uporabo drugih sevov ali vrst je treba obrazložiti.

Priprava živali

Obe očesi vsake poskusne živali, začasno izbrane za poskus, je treba pregledati v 24 urah pred začetkom poskusa. Živali, pri katerih so vidni draženje oči, očesne napake ali že prej nastala poškodba roženice, se ne smejo uporabiti.

Pogoji nastanitve in hranjenja

Živali morajo biti nastanjene posamično. Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi mora biti za kunce 20 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Izogibati se je treba preveč intenzivni svetlobi. Za hranjenje se lahko uporabijo običajne predpisane laboratorijske vrste hrane z neomejeno količino pitne vode.

PRESKUSNI POSTOPEK

Uporaba topičnih anestetikov in sistemskih analgetikov

V postopkih ocene varnosti za oči so priporočljivi naslednji postopki, da se bolečini in trpljenju izogne ali se ju zmanjša. Nadomestijo jih lahko alternativni postopki, ki so bili določeni kot dobra ali boljša možnost za izogibanje bolečini in trpljenju ali njuno lajšanje.

— Šestdeset minut pred nanašanjem preskusne kemikalije se podkožno vbrizga buprenorfin v odmerku 0,01 mg/kg, da se zagotovi terapevtska raven sistemske analgezije. Za buprenorfin in druge podobne opioidne analgetike, ki se dajejo sistemsko, ni znano ali pričakovano, da bi spremenili odzive oči (12).

— Pet minut pred nanašanjem preskusne kemikalije se v vsako oko kane po ena ali dve kapljici topičnega očesnega anestetika (npr. 0,5-odstotni proparakain hidroklorid ali 0,5-odstotni tetrakain hidroklorid). Da ne bi prihajalo do morebitnega motenja študije, se priporoča topični anestetik, ki ne vsebuje konzervansov. Oko vsake živali, ki ni bilo tretirano s preskusno kemikalijo, pač pa s topičnimi anestetiki, se uporablja za kontrolo. Če se pričakuje, da bo preskusna kemikalija povzročila precejšnje bolečine in trpljenje, poskus praviloma ne sme potekati *in vivo*. Vendar je treba v primeru dvoma ali, kadar je preskušanje potrebno, razmisliti o dodatnih odmerkih topičnega anestetika v 5-minutnih časovnih presledkih pred nanašanjem preskusne kemikalije. Uporabniki se morajo zavedati, da bi lahko večkratna uporaba topičnega anestetika nekoliko povečala resnost učinkov in/ali podaljšala čas, ki je potreben, da lezije, ki so jih povzročile kemikalije, izginejo.

— Osem ur po nanosu preskusne kemikalije, se podkožno vbrizgata buprenorfin v odmerku 0,01 mg/kg in meloksikam v odmerku 0,5 mg/kg, da se ohranja stalna terapevtska raven sistemske analgezije. Čeprav ni podatkov, da bi imel meloksikam pri podkožnem vbrizganju enkrat na dan protivnetni učinek na oko, se ga ne sme dati prej kot vsaj 8 ur po nanosu preskusne kemikalije, da bi se izognili vsem morebitnim motnjam pri študiji (12).

— Po prvih 8 urah po nanosu preskusne kemikalije je treba vsakih 12 ur podkožno vbrizgati buprenorfin v odmerku 0,01 mg/kg, skupaj s podkožnim vbrizganjem meloksikama v odmerku 0,5 mg/kg vsakih 24 ur, dokler očesne lezije ne izginejo ter niso več prisotni nobeni klinični znaki bolečine in

▼M7

trpljenja. Da bi zmanjšali pogostost dajanja analgetikov, se lahko razmisli o pripravkih analgetikov s podaljšanim sproščanjem.

— Če vnaprejšnja analgezija in topična anestezija ne zadostujeta, je treba takoj po nanosu preskusne kemikalije dati „odrešilni“ odmerek analgetika. Če žival med študijo kaže znake bolečine in trpljenja, se „odrešilni“ odmerek buprenorfina v višini 0,03 mg/kg podkožno vbrizga takoj in nato ponovno na vsakih 8 ur, če je to potrebno, namesto podkožnega vbrizganja v odmerku 0,01 mg/kg vsakih 12 ur. Meloksikam v odmerku 0,5 mg/kg se podkožno vbrizga vsakih 24 ur, skupaj z „odrešilnim“ odmerkom buprenorfina, vendar ne prej kot vsaj 8 ur po nanosu preskusne kemikalije.

Nanašanje preskusne kemikalije

Preskusno kemikalijo je treba dati v mešiček veznice enega očesa vsake živali, potem ko se spodnja veka nežno potegne stran od zrkla. Veke se nato nežno držijo skupaj približno eno sekundo, da se prepreči izguba materiala. Drugo oko, ki ni tretirano, se uporablja za kontrolo.

Izpiranje

Oči poskusnih živali se ne smejo umivati najmanj 24 ur po vkapanju preskusne kemikalije, z izjemo trdnih snovi (glej odstavek 18) in v primeru takojšnjih jedkih ali dražilnih učinkov. Po 24 urah se lahko oko izpere, če je to ustrezno.

Uporaba satelitske skupine živali za raziskovanje vpliva izpiranja ni priporočena, razen če je znanstveno upravičena. Če je satelitska skupina potrebna, je treba uporabiti dva kunca. Pogoje izpiranja je treba skrbno dokumentirati, npr. čas izpiranja, sestava in temperatura raztopine za izpiranje, trajanje, volumen in hitrost nanašanja.

Velikost odmerka

(1) *Preskušanje tekočih snovi*

Za preskušanje tekočih snovi se uporablja odmerek v višini 0,1 ml. Razpršila se ne smejo uporabljati za vkapanje kemikalije neposredno v oko. Tekoče razpršilo je treba iztisniti in zbrati v posodo pred vkapanjem odmerka v višini 0,1 ml v oko.

(2) *Preskušanje trdnih snovi*

Pri preskušanju trdnih snovi, kašnatih zmesi in zdrobljenih kemikalij, mora imeti uporabljena količina volumen 0,1 ml ali težo, ki ne presega 100 mg. Preskusno kemikalijo je treba zdrobiti v fin prah. Volumen trdnega materiala je treba izmeriti po rahlem zgoščevanju, npr. z rahlim potrkavanjem na merilno posodo. Če fiziološki mehanizmi trdne preskusne kemikalije niso odstranili iz očesa poskusne živali na prvi časovni točki opazovanja 1 uro po nanosu, se lahko oko izplakne s fiziološko raztopino ali destilirano vodo.

(3) *Preskušanje razpršil*

Priporočeno je, da se vsa utekočinjena razpršila in razpršila pod pritiskom zberejo v posodo pred vkapanjem v oko. Izjema so kemikalije v posodah za razpršila pod pritiskom, ki jih ni mogoče zbrati zaradi izhlapevanja. V takih primerih je treba držati oko odprto in preskusno kemikalijo nanesti v oko z enostavnim vbrizgom, ki traja približno eno sekundo, z razdalje 10 cm neposredno pred očesom. Ta razdalja se lahko spreminja glede na pritisk razpršila in njegovo vsebino. Paziti je treba, da se oko ne poškoduje zaradi pritiska razpršila. V ustreznih primerih bo morda treba oceniti potencial za nastanek „mehanske“ poškodbe očesa zaradi moči razpršila.

▼M7

Oceno odmerka iz razpršila je mogoče dobiti z naslednjim poskusom: kemikalija se razprši na tehtalni papir skozi odprtino velikosti kunčjega očesa, ki je nameščena neposredno pred papir. Povečanje teže papirja se uporabi za določitev približne količine, razpršene v oko. Za hlapne kemikalije je odmerek mogoče oceniti s tehtanjem v zbirni posodi pred odstranitvijo preskusne kemikalije ali po njej.

Začetni preskus (*in vivo* preskus draženja oči/jedkosti za oči z uporabo ene živali)

Zelo priporočljivo je, da se poskus *in vivo* izvede najprej na eni živali (glej dodatek k tej preskusni metodi: Strategija zaporednega preskušanja draženja oči in jedkosti za oči). Na podlagi opazovanj je mogoče določiti resnost in popravljivost učinkov pred izvedbo potrditvenega poskusa na drugi živali.

Če rezultati tega poskusa pokažejo, da je kemikalija z uporabo opisanega postopka jedka ali zelo dražilna za oko, se nadaljnji poskusi o dražilnosti za oko ne izvedejo.

Potrditveni preskus (*in vivo* preskus draženja oči z dodatnimi živalmi)

Če se jedek ali zelo dražilen učinek ne opazi v začetnem poskusu, je treba dražilni ali negativni odziv potrditi z uporabo do dveh dodatnih živali. Če se pri začetnem poskusu opazi dražilni učinek, je priporočljivo, da se potrditveni poskus izvede zaporedoma – najprej na eni in šele nato na drugi živali, namesto da se dve dodatni živali izpostavita hkrati. Če se pri drugi živali pojavijo jedki ali zelo dražilni učinki, se poskus ne nadaljuje. Če rezultati pri drugi živali zadostujejo, da se določi razvrstitev glede na nevarnosti, se ne sme izvesti noben poskus več.

Obdobje opazovanja

Obdobje opazovanja mora biti dovolj dolgo, da se lahko v celoti ovrednoti obseg in popravljivost opaženih učinkov. Preskus je treba zaključiti, kadar koli žival pokaže znake hude bolečine ali trpljenja (8). Za določitev popravljivosti učinkov je običajno treba živali opazovati 21 dni po nanašanju preskusne kemikalije. Če se popravljivost opazi pred 21. dnem, je treba poskus takrat zaključiti.

Klinična opazovanja in uvrstitev očesnih reakcij v stopnje

Podrobno je treba oceniti, ali so eno uro po nanosu preskusne kemikalije na očeh prisotne ali odsotne očesne lezije, tako ocenjevanje pa je treba nato ponoviti vsaj enkrat dnevno. Živali je treba prve 3 dni ocenjevati večkrat na dan zaradi pravočasnega sprejetja odločitve o zaključku preskusa. Poskusne živali je treba v celotnem trajanju študije vsaj dvakrat dnevno – ali po potrebi pogosteje – redno ocenjevati, da se odkrijejo klinični znaki bolečine in/ali trpljenja (npr. ponavljajoče se praskanje ali drgnjenje očesa, čezmerno mežikanje, čezmerno solzenje) (9) (10) (11), pri čemer mora med opazovanji preteči vsaj 6 ur. To je potrebno, (i) da se ustrezno oceni, ali živali kažejo znake bolečine in trpljenja, da se sprejmejo informirane odločitve o potrebi po povečanju odmerka analgetikov, ter (ii) da se oceni, ali živali kažejo znake določenih humanih končnih točk, da se sprejmejo informirane odločitve o tem, ali jih je ustrezno humano evtanazirati, in da se zagotovi pravočasno sprejetje takih odločitev. Redno je treba uporabljati obarvanost s fluoresceinom in biomikroskop, kadar je to

▼M7

ustrezno (npr. pri ocenjevanju globine poškodbe v primeru ulceracije roženice), kot pripomoček pri odkrivanju in merjenju očesne poškodbe ter pri oceni, ali so bila izpolnjena določena merila za humano evtanazijo. Za referenčne namene in za trajno evidenco obsega očesnih poškodb se lahko zbirajo digitalne fotografije opaženih lezij. Testiranja na živalih se lahko izvajajo le toliko časa, kolikor je potrebno za pridobitev dokončnih informacij. Živali, ki kažejo hudo bolečino ali trpljenje, je treba nemudoma humano usmrtiti, kemikalijo pa oceniti skladno s tem.

Humano je treba usmrtiti živali z naslednjimi očesnimi lezijami, nastalimi po vkapanju kemikalije (za opis stopenj lezije glej preglednico 1): perforacija roženice ali značilna ulceracija roženice vključno s stafilomom, kri v sprednjem delu očesa, stopnja 4 motnjave roženice, odsotnost svetlobnega refleksa (odziv šarenice stopnje 2), ki traja 72 ur, ulceracija veznične vrečke, nekroza veznične membrane ali žmurke ali odstopanje. Te lezije so namreč na splošno nepopravljive. Poleg tega se priporoča, da se naslednje očesne lezije uporabijo kot humane končne točke za zaključek študij pred koncem načrtovanega 21-dnevnega obdobja opazovanja. Šteje se, da take lezije napovedujejo resne poškodbe, ki jih povzroči draženje ali jedkost, in poškodbe, za katere se pričakuje, da do konca 21-dnevnega obdobja opazovanja ne bodo popolnoma popravljive: velika globina poškodbe (npr. ulceracija roženice, ki se širi prek zgornjih plasti strome), uničenje limbusa > 50 % (kar je razvidno iz bledice veznega tkiva) in resna okužba očesa (gnojni izcedek). Ali kombinacija: vaskularizacije površine roženice (npr. panus), površine obarvanosti s fluoresceinom, ki se na podlagi dnevne ocene sčasoma ne zmanjšuje, in/ali odsotnosti reepitelizacije 5 dni po nanosu preskusne kemikalije se prav tako lahko štejejo kot morebitno uporabna merila, ki vplivajo na klinično odločitev o prezgodnjem zaključku študije. Vendar pa take ugotovitve posamično ne zadostujejo za utemeljitev predčasnega zaključka študije. Ko se ugotovijo resni učinki na oči, se je treba z lečečim veterinarjem ali veterinarjem, usposobljenim za laboratorijske živali, ali osebjem, usposobljenim za odkrivanje kliničnih lezij, posvetovati za klinični pregled, da se oceni, ali bi bilo treba zaradi kombinacije teh učinkov študijo predčasno zaključiti. Pridobiti je treba stopnje očesne reakcije (veznice, roženice in šarenice) ter jih zabeležiti po 1 uri, 24, 48 in 72 urah po nanosu preskusne kemikalije (preglednica 1). Živali, pri katerih se očesne lezije ne pojavijo, se ne smejo usmrtiti prej kot 3 dni po vkapanju. Živali z zmernimi očesnimi lezijami je treba opazovati, dokler lezije ne izginejo ali 21 dni, tj. do takrat, ko se raziskava zaključi. Izvesti in zabeležiti je treba opazovanja vsaj po 1 uri, 24 urah, 48 urah, 72 urah, 7 dneh, 14 dneh in 21 dneh, da se ugotovi status lezij in njihova popravljivost oziroma nepopravljivost. Opazovanja morajo biti po potrebi pogostejša, da se ugotovi, ali je treba poskusno žival iz humanih razlogov evtanazirati ali izključiti iz študije zaradi negativnih rezultatov.

Stopnje očesne reakcije (preglednica 1) je treba zabeležiti pri vsakem pregledu. Poročati je treba tudi o vseh drugih očesnih lezijah (npr. panus, obarvanost, spremembe v sprednjem delu očesa) ali škodljivih sistemskih učinkih.

Za lažji pregled reakcij se lahko uporablja binokularna lupa, ročni oftalmoskop, biomikroskop ali drug ustrezen pripomoček. Potem ko se po 24 urah zabeležijo rezultati opazovanja, se lahko oči nadalje pregledajo s fluoresceinom.

Določanje stopnje očesnih odzivov je neizogibno subjektivno. Da bi izboljšali usklajenost pri določanju stopnje očesnega odziva in pomagali preskuševalnim laboratorijem ter vsem sodelujočim pri oblikovanju in razlagi rezultatov opazovanj, mora biti osebje, ki izvaja ta opazovanja, ustrezno usposobljeno za uporabo sistema določanja stopnje.

▼M7

PODATKI IN POROČANJE

Vrednotenje rezultatov

Rezultate draženja oči je treba oceniti v povezavi z vrsto in resnostjo lezij ter njihovo popravljivostjo oziroma nepopravljivostjo. Posamezni rezultati ne pomenijo absolutnega standarda za dražilne lastnosti kemikalije, ker se ocenjujejo tudi drugi učinki preskusne kemikalije. Namesto tega je treba posamezne rezultate obravnavati kot referenčne vrednosti, ki so pomembni le, če so potrjeni s popolnim opisom in vrednotenjem vseh opažanj.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Utemeljitev preskusa in vivo: analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, že obstoječih podatkov, vključno z rezultati strategije zaporednega preskušanja:

— opis pomembnih podatkov, ki so na voljo pred preskušanjem;

— podatki, pridobljeni na posamezni stopnji preskušanja;

— opis izvedenih preskusov *in vitro*, vključno s podrobnimi podatki o postopkih, in rezultatih, pridobljenih s preskusnimi/referenčnimi kemikalijami;

— opis izvedene študije *in vivo* o draženju kože/jedkosti za kožo, vključno s pridobljenimi rezultati;

— analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za izvedbo študije *in vivo*.

Preskusna kemikalija:

— identifikacijski podatki (npr. kemijsko ime in številka CAS, če je na voljo, čistost, znane nečistote, izvor, številka serije);

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. vrednost pH, hlapnost, topnost, stabilnost, reakcija z vodo);

— v primeru zmesi je treba navesti sestavine, vključno z identifikacijskimi podatki o sestavnih snoveh (npr. kemijska imena in številke CAS, če so na voljo), ter njihove koncentracije;

— uporabljeni odmerek.

Vehikel:

— identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljeni volumen;

— utemeljitev izbire vehikla.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev, obrazložitev za uporabo živali, če to ni kunec beličnik;

— starost vsake živali ob začetku študije;

— število živali po spolu v preskusni in kontrolni skupini (če je potrebno);

— teža posamezne živali ob začetku in zaključku poskusa;

— izvor, nastanitveni pogoji, vrsta hrane itd.

▼M7

Anestetiki in analgetiki:

— odmerki in čas dajanja v primeru dajanja topičnih anestetikov in sistemskih analgetikov;

— če se uporabi lokalni anestetik, njegova identifikacija, čistost, vrsta in morebitni medsebojni vpliv s preskusno kemikalijo.

Rezultati:

— opis metode, uporabljene za merjenje dražilnosti na vsaki časovni točki opazovanja (npr. ročni oftalmoskop, biomikroskop, fluorescein);

— preglednica s podatki o dražilnem/jedkem odzivu za vsako žival na vsaki časovni točki opazovanja do odstranitve vsake živali iz poskusa;

— opis stopnje in narave opaženega draženja ali jedkosti;

— opis drugih morebitnih opaženih lezij v očesu (npr. vaskularizacije, nastanek panusov, zlepkov, madežev);

— opis neočesnih lokalnih in sistemskih škodljivih učinkov, zabeleženje kliničnih znakov bolečine in trpljenja, digitalne fotografije in morebitne histopatološke ugotovitve.

Razprava o rezultatih

Razlaga rezultatov

Sklepanje o veljavnosti rezultatov študij draženja oči na laboratorijskih živalih za ljudi je veljavno le v omejeni meri. V mnogih primerih je kunec beličnik bolj občutljiv na snovi, ki dražijo oči ali so jedke za oči, kot ljudje.

Pri razlagi podatkov je treba paziti, da se izključi draženje, ki je posledica sekundarne infekcije.

VIRI

(1) Barratt, M. D. idr. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, str. 410–429.

(2) de Silva, O. idr. (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, str. 159–164.

(3) Worth, A. P. in Fentem, J. H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, str. 161–177.

(4) Young, J. R. idr. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, str. 19–26.

(5) Neun, D. J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, str. 227–231.

(6) Fentem, J. H. idr. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, str. 483–524.

(7) Poglavje B.4 te priloge: *Akutna toksičnost: dermalna dražilnost/jedkost*.

▼**M7**

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright, E. M., Marcella, K. L. in Woodson, J. F. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, maj/junij, str. 20–36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, ZDA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm.

(13) Poglavje B.40 te priloge: *Jedkost za kožo in vitro: preskus transkutane električne upornosti (TER)*.

(14) Poglavje B.40bis te priloge: *Jedkost za kožo in vitro: preskus z modelom človeške kože*.

(15) OECD (2006), *preskus št. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, oddelek 4, OECD Pariz.

(16) Poglavje B.47 te priloge: *Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti rožnice goveda za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči*.

(17) Poglavje B.48 te priloge: Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3. izdaja, EPA737-B-96-001, Washington, DC: ZDA, Environmental Protection Agency.

(19) ZN (2011). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in usklajevanje kemikalij (GHS). Četrta revidirana izdaja, New York in Ženeva: Publikacije Združenih narodov.

(20) ES (2008), Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006. Uradni list Evropske unije L 353, str. 1–1355.

(21) Smernice agencije ECHA za zahteve po informacijah in oceno kemijske varnosti, poglavje R.7a: Posebne smernice o končnih točkah:

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

▼M7

Preglednica 1

Razvrščanje očesnih lezij v stopnje

Roženica	Razred
Motnjava: stopnja gostote (odčitati jo je treba na najgostejšem predelu) (*)	
Ni ulceracije ali motnjave	0
Posamična ali razpršena območja motnjave (ne le rahlo manjši normalni lesk), podrobnosti šarenice jasno vidne	1
Lahko razločljivo prosojno območje; podrobnosti šarenice rahlo zabrisane	2
Biserovinasta površina; podrobnosti šarenice niso vidne; velikost zenice se komaj razloči	3
Motna roženica; šarenica se prek motnjave ne razloči	4
Najvišji možni razred: 4	
Šarenica	
Normalna	0
Izrazito poglobljene gube, kongestija, zatekanje, zmerna hiperemija okoli roženice; ali injekcija; šarenica se odziva na svetlobo (počasen odziv je pozitiven)	1
Krvavenje, hudo uničenje ali ni odziva na svetlobo	2
Najvišji možni razred: 2	
Veznica	
Rdečina (se nanaša na palpebralno in bulbarno veznico; razen roženice in šarenice)	
Normalna	0
Nekatere krvne žilice nedvomno hiperemične (injicirane)	1
Razpršeno, škrlatno obarvanje; posameznih žilic ni mogoče zlahka razločiti	2
Razširjeno temno rdeče obarvanje	3
Najvišji možni razred: 3	
Hemoza	
Otekanje (nanaša se na veke in/ali žmurke)	
Normalna	0
Kakšno koli otekanje nad normalnim	1
Očitna oteklina z delnim vihanjem vek navzven	2
Oteklina, pri kateri so veke zaprte do približno polovice	3
Oteklina, pri kateri so veke več kot pol zaprte	4
Najvišji možni razred: 4	

(*) Zabeležiti je treba predel motnjave roženice.

▼M7

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Kisla/alkalna rezerva: Za kisle pripravke je to količina natrijevega hidroksida (v g)na 100 g pripravka, ki je potrebna za proizvodnjo določene vrednosti pH. Za alkalne pripravke je to količina natrijevega hidroksida (v g), ki je enakovredna količini žveplove kisline v g na 100 g pripravka, potrebna za proizvodnjo določene vrednosti pH (Young idr. 1988).

Kemikalija: snov ali zmes.

Nedražilne snovi: snovi, ki niso razvrščene v kategorije I, II ali III po EPA, kategorije 1, 2, 2A ali 2B po GHS ali kategoriji 1 ali 2 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Jedka snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroča nepopravljivo poškodbo očesnega tkiva; (b) kemikalije, ki so razvrščene v kategorijo 1 po GHS, kategorijo I po EPA ali kategorijo 1 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroči popravljivo poškodbo očesa; (b) kemikalije, ki so razvrščene v kategoriji II ali III po EPA, kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ali kategorijo 2 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Zelo dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroči poškodbo tkiva, ki po 21 dneh po nanosu ne izgine ali resno fizično poslabša vid; (b) kemikalije, ki so razvrščene v kategorijo 1 po GHS, kategorijo I po EPA ali kategorijo 1 po EU dražilnih snovi za oči (17) (18) (19).

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Stopenjski pristop: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Zanesljivost dokazov (proces): prednosti in slabosti zbirke podatkov se uporabijo kot podlaga za sprejetje sklepa, ki iz posameznih podatkov morda ni razviden.

▼M7

DODATEK K PRESKUSNI METODI B.5 [1]

ZAPOREDNO TESTIRANJE DRAŽENJA OČI IN JEDKOSTI ZA OČI

Splošni preudarki

Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali se je treba izogniti nepotrebni uporabi živali in zmanjšati število poskusov, ki bi najverjetneje povzročili resne odzive pri živalih. Vse informacije o kemikalijah, ki se nanašajo na njihovo morebitno dražilnost/jedkost za oči, je treba oceniti pred odločitvijo o preskušanju *in vivo*. Morda že obstaja dovolj dokazov za razvrstitev preskusne kemikalije glede na njen potencial jedkosti za oči ali draženja oči, ne da bi bilo treba izvesti poskuse na laboratorijskih živalih. Analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, in zaporedno testiranje bosta zato zmanjšala potrebo po preskušanju *in vivo*, zlasti če bi kemikalija verjetno povzročila resne reakcije.

Priporočljivo je, da se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ocenijo obstoječe informacije v zvezi s tem, ali kemikalija draži oči in je jedka za oči, ter za odločitev, ali je treba poleg študij *in vivo* na očeh izvesti dodatne študije, ki bi pomagale opredeliti takšen potencial. Kadar so potrebne nadaljnje študije, je priporočljiva uporaba zaporednega preskušanja, da se pridobijo ustrezni eksperimentalni podatki. Pri snoveh, ki nimajo zgodovine preskušanja, je treba za pridobitev podatkov, potrebnih za oceno njihovega potenciala jedkosti za oči/draženja oči, uporabiti strategijo zaporednega preskušanja. Prvotna strategija preskušanja, opisana v tem dodatku, je bila razvita na delavnici OECD (1). Kasneje je bila potrjena in razširjena v Usklajen celostni sistem razvrstitve kemijskih snovi glede na nevarnosti za zdravje ljudi in vplive na okolje, kot sta ga novembra 1998 na 28. skupnem zasedanju potrdila Odbor za kemikalije in Delovna skupine za kemikalije (2) ter kot ga je leta 2011 posodobila skupina strokovnjakov OECD.

Čeprav to testiranje ni sestavni del preskusne metode B.5, predstavlja priporočeni pristop za določitev lastnosti, ki se nanašajo na draženje oči/jedkost za oči. Ta pristop je hkrati dobra praksa in etično merilo uspešnosti za preskušanje draženja oči/jedkosti za oči *in vivo*. Preskusna metoda vsebuje smernice za izvajanje preskusa *in vivo* in povzema dejavnike, ki jih je treba obravnavati pred začetkom takega preskusa. Z zaporednim testiranjem se zagotavlja, da se s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ocenijo obstoječi podatki o lastnostih kemikalij, ki dražijo oči/so jedke za oči, in da se s stopenjskim pristopom pridobijo ustrezni podatki o kemikalijah, za katere so potrebne dodatne študije ali študije niso bile izvedene. V testiranje je najprej vključena izvedba potrjenih in sprejetih preskusov *in vitro* ali *ex vivo*, nato pa študije v okviru preskusne metode B.4 v posebnih okoliščinah (3) (4).

Opis postopnega preskušanja

Preden se začnejo izvajati preskusi kot deli zaporednega testiranja (diagram), je treba oceniti vse razpoložljive podatke, da se določi potreba po preskušanju *in vivo* na očeh. Čeprav se pomembne informacije lahko pridobijo iz ocene posameznih parametrov (npr. najvišje vrednosti pH), je treba oceniti vse obstoječe

[1] Za uporabo celostne strategije preskušanja draženja oči v skladu z uredbo REACH glej tudi Smernice agencije ECHA za zahteve po informacijah in oceno kemijske varnosti, Poglavje R.7a: Posebne smernice o končnih točkah: http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

▼M7

podatke. Pri sprejemanju odločitve, ki temelji na zanesljivosti dokazov, je treba oceniti vse ustrezne podatke o učinkih zadevne kemikalije ali strukturno podobnih kemikalij in navesti obrazložitev za tako odločitev. Glavni poudarek mora biti namenjen obstoječim podatkom o vplivu kemikalije na ljudi in živali, čemur sledijo rezultati preskušanja *in vitro* ali *ex vivo*. Študijam *in vivo* jedkih kemikalij je treba izogibati, kadar koli je to mogoče. Dejavniki, ki se upoštevajo v strategiji preskušanja, so med drugim:

Ocena obstoječih podatkov, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatkov *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod (prvi korak).

Najprej je treba proučiti obstoječe podatke, ki se nanašajo na ljudi, npr. klinične in poklicne študije ter poročila o posameznih primerih, in/ali podatke o testiranju na živalih iz študij na očeh in/ali podatke *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod za draženje oči/jedkost za oči, saj zagotavljajo informacije, ki so neposredno povezane z učinki na oči. Nato je treba oceniti razpoložljive podatke iz študij na ljudeh in/ali živalih, s katerimi se proučuje jedkost za kožo/draženje kože, in/ali študij *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod za jedkost za kožo. Kemikalije, za katere je znano, da so jedke ali zelo dražilne za oči, se ne smejo vkapati v oči živali, enako velja tudi za kemikalije, ki so jedke ali zelo dražilne za kožo; take kemikalije je treba prav tako obravnavati kot jedke in/ali dražilne za oči. Kemikalij, za katere je v predhodno opravljenih študijah na očeh dovolj dokazov, da niso jedke ali dražilne, prav tako ni treba preskusiti s študijami *in vivo* na očeh.

Analiza razmerja med strukturo in aktivnostjo (SAR) (drugi korak).

Treba je upoštevati rezultate preskušanj strukturno podobnih snovi, če so na voljo. Kadar so na voljo zadostni podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, o strukturno podobnih snoveh ali mešanicah takih snovi in je iz njih razviden njihov potencial jedkosti za oči/draženja oči, se lahko domneva, da bo preskusna kemikalija povzročila enake odzive. V navedenih primerih kemikalije morda ni treba preskusiti. Negativni podatki iz študij o strukturno podobnih snoveh ali mešanicah takih snovi v skladu s strategijo zaporednega preskušanja niso zadosten dokaz o tem, da kemikalija ni jedka/dražilna. Treba je uporabiti potrjene in sprejete pristope SAR, da se opredeli potencial za jedkost in dražilne učinke na kožo in oči.

Fizikalno-kemijske lastnosti in kemijska reaktivnost (tretji korak).

Kemikalije, ki kažejo najskrajnejše vrednosti pH, kot na primer $\leq 2{,}0$ ali $\geq 11{,}5$, imajo lahko močne lokalne učinke. Če je najskrajnejša vrednost pH podlaga za opredeljevanje kemikalije kot jedke ali dražilne za oči, potem se lahko upošteva tudi njena kisla/alkalna rezerva (pufrska kapaciteta) (5) (6) (7). Če pufrska kapaciteta kaže na to, da kemikalija ne sme biti jedka za oči (npr. kemikalije z najvišjo vrednostjo pH in nizko kislo/alkalno rezervo), je treba to potrditi z izvedbo dodatnega preskušanja, po možnosti s potrjenim in sprejetim preskusom *in vitro* ali *ex vivo* (glej odstavek 10).

Upoštevanje drugih obstoječih informacij (četrti korak).

V tej fazi je treba oceniti vse razpoložljive informacije o sistemski toksičnosti po dermalni poti. Upoštevati je treba tudi akutno dermalno toksičnost preskusne kemikalije. Če se pokaže, da je preskusna kemikalija po dermalni poti zelo toksična, je ni treba preskusiti v očesu. Čeprav ni nujno, da so akutna dermalna toksičnost in draženje oči/jedkost za oči medsebojno povezani, se lahko

▼M7

domneva, da bo sredstvo, ki je zelo toksično po dermalni poti, pokazalo visoko stopnjo toksičnosti tudi po vkapanju v oko. Take podatke je treba proučiti tudi med drugim in tretjim korakom.

Ocena jedkosti kemikalije za kožo, če se zahteva tudi za regulativne namene (peti korak).

Potencial, da je kemikalija jedka za kožo in zelo draži kožo, je treba najprej oceniti v skladu s preskusno metodo B.4 (4) in spremnim dodatkom (8), vključno z uporabo potrjenih in mednarodno sprejetih preskusnih metod *in vitro* za jedkost za kožo (9) (10) (11). Če se izkaže, da je kemikalija jedka ali zelo dražilna za kožo, se lahko šteje tudi, da je jedka ali zelo dražilna za oko. Zato ni potrebno nobeno dodatno preskušanje. Če kemikalija ni jedka ali zelo dražilna za kožo, je treba izvesti preskus *in vitro* ali *ex vivo* na očeh.

Rezultati preskusov *in vitro* ali *ex vivo* (šesti korak).

Kemikalije, pri katerih so se pri preskusu *in vitro* ali *ex vivo* (12) (13), ki je bil potrjen in mednarodno sprejet posebej za ocenjevanje jedkosti za oči/draženja oči, pokazale jedke ali zelo dražilne lastnosti, ni treba testirati na živalih. Lahko se domneva, da bodo take snovi povzročile podobne resne učinke *in vivo*. Če potrjeni in sprejeti preskusi *in vitro*/*ex vivo* niso na voljo, se lahko šesti korak preskoči ter se izvede neposredno sedmi korak.

Preskus *in vivo* na kuncih (sedmi in osmi korak).

Pri preskušanju *in vivo* na očeh je treba najprej izvesti začetni preskus na eni živali. Če rezultati tega preskusa pokažejo, da je kemikalija zelo dražilna ali jedka za oči, nadaljnjega preskušanja ni treba izvesti. Če se pri navedenem poskusu niso odkrili jedki ali zelo dražilni učinki, se izvede potrditveni poskus na dveh dodatnih živalih. Od rezultatov potrditvenega poskusa je odvisno, ali so potrebni dodatni poskusi [glej preskusno metodo B.5].

▼M7

STRATEGIJA PRESKUŠANJA IN OCENJEVANJA DRAŽENJA OČI/JEDKOSTI ZA OČI

	Dejavnost	Ugotovitev	Sklepne ugotovitve
1.	Obstoječi podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatki *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod, ki kažejo učinke na oči	Huda poškodba oči	Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije; upoštevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.
		Dražilna snov za oči	Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije; upoštevati, da je snov dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.
		Ni jedko/ni dražilno za oči	Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije; upoštevati, da snov ni jedka in dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.
	Obstoječi podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatki *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod, ki kažejo jedke učinke na kožo	Jedka snov za kožo	Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.
	Obstoječi podatki, ki se nanašajo na ljudi in/ali živali, in/ali podatki *in vitro* iz potrjenih in mednarodno sprejetih metod, ki kažejo zelo dražilne učinke na kožo	Zelo dražilna snov za kožo	Domnevati, da je snov dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.
	↓		
	Informacije niso na voljo, ali pa razpoložljive informacije niso dokončne		
	↓		
2.	Izvedba SAR za jedkost za oči/draženje oči	Predvideti hudo poškodbo oči	Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.
		Predvideti draženje oči	Domnevati, da je snov dražilna za oči. Preskušanje ni potrebno.
	Upoštevati SAR za jedkost za kožo	Predvideti jedkost za kožo	Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.
	↓		
	Predvidevanja niso mogoča, ali pa niso dokončna ali negativna		
	↓		
3.	Izmeriti vrednost pH (pufrsko kapaciteto, če je ustrezno)	vrednost pH $\leq$ 2 ali $\geq$ 11,5 (z visoko pufrsko kapaciteto, če je ustrezno)	Domnevati, da je snov jedka za oči. Preskušanje ni potrebno.
	↓		
	2< vrednost pH < 11,5 ali vrednost pH $\leq$ 2,0 ali $\geq$ 11,5 z nizko pufrsko kapaciteto ali brez nje, če je to ustrezno		
	↓		
4.	Upoštevati obstoječe podatke o sistemski toksičnosti po dermalni poti	Zelo toksično pri koncentracijah, ki bi se preskusile v očesu.	Kemikalija bi bila za preskušanje preveč toksična. Preskušanje ni potrebno.

▼M7

	Dejavnost	Ugotovitev	Sklepne ugotovitve
	↓		
	Take informacije niso na voljo ali snov ni zelo toksična		
	↓		
5.	S preskusi oceniti potencial za draženje kože glede na strategijo preskušanja iz poglavja B.4 te priloge, če je to potrebno tudi za regulativne namene	Jedek ali zelo dražilen odziv	Domnevati, da je snov jedka za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
	↓		
	Kemikalija ni jedka ali zelo dražilna za kožo		
	↓		
6.	Izvesti potrjene in sprejete preskuse *in vitro* ali *ex vivo* na očeh	Jedek ali zelo dražilen odziv	Domnevati, da je kemikalija jedka ali zelo dražilna za oči, če se lahko izvedeni preskus uporabi za opredelitev jedkih/zelo dražilnih snovi in je kemikalija zajeta v področju uporabe preskusa. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
		Dražilen odziv	Domnevati, da je kemikalija dražilna za oči, če se lahko izvedeni preskusi uporabijo za pravilno opredelitev jedkih, zelo dražilnih in dražilnih snovi ter je kemikalija zajeta v področju uporabe preskusov. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
		Nedražilen odziv	Domnevati, da kemikalija ni dražilna za oči, če se lahko izvedeni preskusi uporabijo za pravilno opredelitev snovi, ki niso dražilne, za njihovo pravilno razlikovanje od kemikalij, ki so dražilne, zelo dražilne ali jedke za oči, ter je kemikalija zajeta v področju uporabe preskusa. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
	↓		
	Potrjeni in sprejeti preskusi in vitro ali ex vivo na očeh se ne morejo uporabiti za opredelitev		
	↓		

▼M7

	Dejavnost	Ugotovitev	Sklepne ugotovitve
7.	Izvedba začetnega poskusa *in vivo* na očesu kunca z uporabo ene živali	Huda poškodba oči	Upoštevati, da je snov jedka za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
	↓		
	Ni resne poškodbe ali ni odziva		
	↓		
8.	Izvesti potrditveni poskus na eni ali dveh dodatnih živalih.	Jedko ali dražilno	Upoštevati, da je snov jedka ali dražilna za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.
		Ni jedko ali dražilno	Upoštevati, da snov ni jedka ali dražilna za oči. Nadaljnje preskušanje ni potrebno.

VIRI

(1) OECD (1996). program preskusnih smernic OECD: Končno poročilo z delavnice OECD z naslovom „Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods“. Organizirana je bila od 22. do 24. januarja 1996 v Solni na Švedskem (http://www. oecd. org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, kakor je bil potrjen na 28. skupnem zasedanju Odbora za kemikalije in Delovne skupine za kemikalije, november 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A. P. in Fentem, J. H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, str. 161–177.

(4) Poglavje B.4 te priloge: Akutna toksičnost: dermalna dražilnost/jedkost.

(5) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P. in Worth, W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, str. 19–26.

(6) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsail, D. J., Holzhutter, H. G. in Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, str. 483–524.

(7) Neun, D. J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, str. 227–231.

(8) Dodatek k poglavju B.4 te priloge: Zaporedna strategija preskušanja za dermalno dražilnost in jedkost.

(9) Poglavje B.40 te priloge: Jedkost za kožo *in vitro*: preskus transkutane električne upornosti (TER).

(10) Poglavje B.40bis te priloge: Jedkost za kožo *in vitro*: preskus z modelom človeške kože.

(11) OECD (2006). *Preskus št. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, oddelek 4, OECD Pariz.

▼**M7**

(12) Poglavje B.47 te priloge: Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.

(13) Poglavje B.48 te priloge: Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.

▼B

B.6 **SENZIBILIZACIJA KOŽE**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Opombe:

Občutljivost preskusov in njihova sposobnost, da odkrijejo morebitne senzibilizatorje človeške kože, veljata za pomembni v sistemu razvrščanja toksičnosti v zvezi z javnim zdravjem.

Ni ene same preskusne metode, ki bi lahko ustrezno opredelila vse snovi s potencialom za senzibilizacijo človeške kože in bila hkrati uporabna za vse snovi.

Pri izbiri preskusa je treba upoštevati dejavnike, kakršne so fizikalne lastnosti snovi, vključno z njeno sposobnostjo penetracije v kožo.

Razviti sta bili dve vrsti preskusov na morskih prašičkih: pomožni preskusi, pri katerih se alergično stanje potencira z raztopitvijo ali suspendiranjem preskusne snovi v kompletnem Freundovem adjuvantu (KFA), in preskusi, pri katerih se adjuvant ne uporablja.

Pomožni preskusi so običajno natančnejši pri napovedovanju verjetnega senzibilizacijskega učinka neke snovi na človeško kožo od tistih metod, ki ne uporabljajo kompletnega Freundovega adjuvanta, in so zato primernejši.

Med pomožnimi preskusi se pogosto uporablja maksimizacijski preskus na morskih prašičkih (Gpmt). Čeprav se za odkrivanje potenciala snovi, da povzroči senzibilizacijo kože, lahko uporabijo mnoge druge metode, se Gpmt šteje za najboljši pomožni preskus.

Za mnoge razrede kemikalij se preskusi, ki ne uporabljajo adjuvanta (med katerimi se največ uporablja Buehlerjev preskus), štejejo za manj občutljive.

V nekaterih primerih lahko obstajajo utemeljeni razlogi za izbiro Buehlerjevega preskusa, ki namesto intradermalne injekcije, uporabljene v preskusu maksimizacije na morskih prašičkih, vključuje lokalno nanašanje. Če se uporabi Buehlerjev preskus, mora biti ta izbira znanstveno utemeljena.

V tej metodi sta opisana maksimizacij ski preskus na morskih prašičkih in Buehlerjev preskus. Uporabijo se lahko druge metode, če so dobro validirane in znanstveno utemeljene.

Če je rezultat priznanega predhodnega preskusa pozitiven, se lahko preskusna snov šteje za možnega povzročitelja senzibilizacij e in ni potrebna izvedba dodatnega preskusa na morskih prašičkih. Če pa je rezultat takšnega preskusa negativen, je treba izvesti preskus na morskih prašičkih v skladu s postopkom, opisanim v tej preskusni metodi.

Glej tudi del B splošnega uvoda.

▼B

1.2 OPREDELITVE POJMOV

Senzibilizacija kože: (alergijski kontaktni dermatitis) je imunološko pogojena kožna reakcija na neko snov. Pri človeku so značilne reakcije lahko srbenje, eritem, edem, papule, mehurji, gnojni mehurčki ali kombinacija teh reakcij. Pri drugih vrstah so reakcije lahko različne ter sta lahko vidna zgolj eritem in edem.

Indukcijska izpostavljenost: eksperimentalna izpostavljenost subjekta preskusni snovi za povzročitev hipersenzibilnega stanja.

Indukcijsko obdobje: najmanj enotedensko obdobje po indukcijski izpostavljenosti, v katerem se lahko razvije hipersenzibilno stanje.

Provokacij ska izpostavljenost: eksperimentalna izpostavljenost predhodno tretiranega subjekta preskusni snovi, izvedena po indukcijskem obdobju, da bi se ugotovilo, če subjekt reagira hipersenzibilno.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Vsakih šest mesecev je treba oceniti senzibilnost in zanesljivost uporabljene eksperimentalne tehnike z uporabo snovi, za katere se ve, da povzročajo blago do zmerno senzibilizacijo kože.

Če je preskus pravilno izveden, se lahko v pomožnem preskusu za blage/zmerne senzibilizatorje pričakuje vsaj 30 % reakcija in vsaj 15 % v neadjuvantnem preskusu.

Prednostno se uporabljajo naslednje snovi.

Števila CAS	Števila Einecs	Imena Einecs	Splošna imena
101-86-0	202-983-3	α-heksilcinamaldehid	α -heksilcinamaldehid
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptobenzotiazol)	kaptaks
94-09-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Uporabijo se lahko druge kontrolne snovi, ki izpolnjujejo zgoraj navedena merila, če to upravičujejo okoliščine.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Na začetku so preskusne živali izpostavljene preskusni snovi z intradermalnimi injekcijami in/ali epidermalnim nanosom (indukcijska izpostavljenost). Po 10- do 14-dnevnem počivalnem obdobju (indukcijsko obdobje), v katerem se lahko razvije imunska reakcija, so živali izpostavljene provokacijskemu odmerku. Obseg in stopnja kožne reakcije na provokacijsko izpostavljenost pri preskusnih živalih se primerja z reakcijo, opaženo pri živalih kontrolne skupine, pri katerih med indukcijo posnemajo tretiranje in ki jih provokacij sko izpostavijo.

1.5 OPIS PRESKUSNIH METOD

Če je odstranitev preskusne snovi nujna, se to doseže z uporabo vode ali ustreznega topila, ne da bi se spremenila obstoječa reakcija ali okrnil epidermis.

▼B

1.5.1 *Maksimizacijski preskus na morskih prašičkih (GPMT)*

1.5.1.1 P r i p r a v e

Zdravi mladi odrasli albino morski prašički so najmanj 5 dni pred preskusom aklimatizirani na razmere v laboratoriju. Pred preskusom so živali naključno razdeljene v skupine, ki bodo tretirane. Glede na preskusno metodo, ki je uporabljena, se dlaka lahko odvzame s striženjem, britjem ali kemično depilacijo. Pri tem je treba paziti, da koža ostane nepoškodovana. Živali je treba pred začetkom in na koncu preskusa stehtati.

1.5.1.2 P r e s k u s n i p o g o j i

1.5.1.2.1 Preskusne živali

Uporabljajo se albino morski prašički tistih sevov, ki se običajno uporabljajo v laboratorijih.

1.5.1.2.2 Število in spol

Uporabijo se lahko živali moškega in/ali ženskega spola. Samice morskih prašičkov morajo biti nuliparne in ne breje.

Skupina, ki bo tretirana, mora biti sestavljena iz najmanj 10, kontrolna skupina pa iz najmanj 5 živali. Če je prva skupina obsegala manj kakor 20 primerkov in druga manj kakor 10 ter ni mogoče sklepati, da je preskusna snov senzibilizator, se močno priporoča nadaljnje preskušanje na najmanj 20 preskusnih in 10 kontrolnih živali.

1.5.1.2.3 Velikost odmerkov

Koncentracija preskusne snovi, uporabljene za vsako indukcijsko izpostavljenost, naj bo sistemsko dobro tolerirana in naj ustreza najvišjemu odmerku, ki lahko povzroči blago do zmerno draženje kože. Koncentracija, ki se uporabi za provokacijsko izpostavljenost, naj ustreza najvišjemu odmerku, ki ne povzroči draženja. Če je potrebno, se lahko ustrezne koncentracije določijo s pilotno študijo, izvedeno na dveh ali treh živalih. V ta namen je priporočljiva uporaba živali, ki so bile tretirane s kompletnim Freundovim adjuvantom (KFA).

1.5.1.3 P o s t o p e k

1.5.1.3.1 Indukcija

Dan 0 – tretirana skupina

V ramenske dele, s katerih so bile odstranjene dlake, se vbrizgajo trije pari intradermalnih injekcij volumna 0,1 ml, in sicer vsaka injekcija iz para na svoji strani sredinske črte.

Injekcija 1: zmes 1:1 (v/v) KFA/voda ali fiziološka raztopina

Injekcija 2: preskusna snov v ustreznem nosilcu pri izbrani koncentraciji

Injekcija 3: preskusna snov pri izbrani koncentraciji, formulirana v zmesi 1:1 (v/v) KFA/voda ali fiziološka raztopina

V injekciji 3 so v vodi topne snovi raztopljene v vodni fazi, preden se zmešajo s KFA. Lipotopne ali netopne snovi so suspendirane v KFA, preden so kombinirane z vodno fazo. Končna koncentracija preskusne snovi mora biti enaka tisti, ki je bila uporabljena v injekciji 2.

▼B

Injekciji 1 in 2 se vbrizgata ena poleg druge in čim bliže glavi, medtem ko se injekcija 3 vbrizga proti repnemu delu preskusnega območja.

Dan 0 – kontrolna skupina

Na ista območja kakor pri tretiranih živali se dajo tri serije dveh intradermalnih injekcij volumna 0,1 ml.

Injekcija 1: zmes 1:1 (v/v) KF A/voda ali fiziološka raztopina

Injekcija 2: nerazredčeno sredstvo

Injekcija 3: 50 % m/v formulacija nosilca v zmesi 1:1 (v/v) KF A/voda ali fiziološka raztopina.

Dan 5–7 – tretirana skupina in kontrolna skupina

Približno štiriindvajset ur pred lokalnim indukcijskim nanosom, če snov ni senzibilizator kože, je preskusno območje po striženju na kratko in/ali britju tretirano z 0,5 ml 10 % natrijevega lauril sulfata v vazelinu zato, da bi bilo povzročeno lokalno draženje.

Dan 6–8 – tretirana skupina

S preskusnega območja se spet odstranijo dlake. Filtrirni papir (2 × 4 cm), povsem impregniran s preskusno snovjo v ustreznem nosilcu, se nanese na preskusno območje in je z okluzivnim povojem v stiku s kožo 48 ur. Izbira nosilca mora biti utemeljena. Trde snovi so fino uprašene in inkorporirane v ustrezni nosilec. Če je primerno, se tekočine lahko nanesejo nerazredčene.

Dan 6–8 – kontrolna skupina

S preskusnega območja se spet odstranijo dlake. Na preskusno območje se podobno nanese zgolj nosilec, ki je z okluzivnim povojem v stiku s kožo 48 ur.

1.5.1.3.2 Provokacija

Dan 20–22 – tretirana skupina in kontrolna skupina

Z bokov tretiranih in kontrolnih živali se odstrani dlaka. Na en bok živali se nanese obliž ali gaza, impregnirana s preskusno snovjo in, če je primerno, se tudi na drugi bok lahko nanese obliž ali gaza, impregnirana zgolj z nosilcem. Obliži so 24 ur v stiku s kožo z okluzivnim povojem.

1.5.1.3.3 Opazovanje in ocenjevanje: tretirana skupina in kontrolna skupina

— približno 21 ur po odstranitvi obliža je treba provokacijsko območje očistiti ter ostriči na kratko in/ali obriti in depilirati, če je treba,

— približno 3 ure pozneje (približno 48 ur od začetka provokacijskega nanosa) se opazuje in zabeleži reakcija kože glede na ocene, prikazane v dodatku,

— približno 24 ur po tem opazovanju se opravi in spet zabeleži drugo opazovanje (72 ur).

Spodbuja se hitro čekiranje preskusnih in kontrolnih živali.

Če je treba pojasniti rezultate, pridobljene v prvi provokaciji, je treba preučiti možnost izvedbe druge provokacije (t. j. ponovne provokacije), če je to primerno z novo kontrolno skupino, približno teden dni po prvi provokaciji. Ponovna provokacij a se lahko izvede tudi s prvotno kontrolno skupino.

▼B

Vse kožne reakcije in kakršni koli nenavadni izsledki, vključno s sistemskimi reakcijami, ki so posledica indukcije in postopkov provokacij e, je treba opazovati in zabeležiti v skladu z ocenjevalno lestvico po Magnussonu/Kligmanu (glej dodatek). Za razjasnitev dvomljivih reakcij se lahko izvedejo drugi postopki, npr. histopatološka raziskava ali meritev debeline kožne gube.

1.5.2 *Buehlerjev preskus*

1.5.2.1 P r i p r a v e

Zdravi mladi odrasli albino morski prašički se najmanj 5 dni pred preskusom aklimatizirajo na razmere v laboratoriju. Pred preskusom so živali naključno razdeljene v skupine, ki bodo tretirane. Glede na uporabljeno preskusno metodo se dlaka lahko odstrani s striženjem, britjem ali morda s kemično depilacijo. Pri tem je treba paziti, da koža ostane nepoškodovana. Živali je treba pred začetkom in na koncu preskusa stehtati.

1.5.2.2 P r e s k u s n i p o g o j i

1.5.2.2.1 Preskusne živali

Uporabljajo se albino morski prašički tistih sevov, ki se običajno uporabljajo v laboratorijih.

1.5.2.2.2 Število in spol

Uporabijo se lahko živali moškega in/ali ženskega spola. Samice morskih prašičkov morajo biti nuliparne in ne breje.

Skupina, ki bo tretirana, mora biti sestavljena iz najmanj 20, kontrolna skupina pa iz najmanj 10 živali.

1.5.2.2.3 Velikost odmerkov

Koncentracija preskusne snovi, uporabljene za vsako indukcijsko izpostavljenost, mora ustrezati najvišjemu odmerku, ki lahko povzroči blago, vendar ne čezmerno draženje kože. Koncentracija, ki se uporabi za provokacijsko izpostavljenost, mora ustrezati najvišjemu odmerku, ki še ne povzroči draženja.

Če je potrebno, se lahko ustrezne koncentracije določijo s pilotno študijo, ki se opravi na dveh ali treh živalih.Pri preskusnih vodotopnih snoveh je najprimernejše, da se kot nosilec uporabi voda ali razredčena nedražilna raztopina surfaktanta. Za druge preskusne snovi so primernejše mešanice 80 % etanola in vode za indukcijo, za provokacijo pa aceton.

1.5.2.3 P o s t o p e k

1.5.2.3.1 Indukcija

Dan 0 – tretirana skupina

Z enega boka živali se odstrani dlaka (na kratko ostriže). Obliž, ki bo uporabljen v preskusu, je treba popolnoma impregnirati s preskusno snovjo v ustreznem nosilcu (izbira nosilca mora biti utemeljena; če je primerno, se tekočine lahko nanesejo nerazredčene).

Obliž je treba nanesti na preskusno območje in ga z okluzivnim obližem ali gazo ali ustreznim povojem držati v stiku s kožo 6 ur.

▼B

Obliž mora biti okluziven. Lahko se uporabi okrogla ali štirikotna vatna blazinica velikosti približno 4–6 cm^2. Za zagotovitev okluzije je primerna imobilizacija z ustrezno napravo za imobilizacijo. Če se uporabi povoj, utegne biti potrebna dodatna izpostavljenost.

Dan 0 – kontrolna skupina

Z enega boka živali je odstranjena dlaka (na kratko ostrižena). Na preskusno območje se podobno kakor pri tretirani skupini nanese zgolj nosilec. Obliž se nanese na preskusno območje tako, da je okluzivni obliž ali gaza ali ustrezen povoj v stiku s kožo 6 ur. Če se lahko dokaže, da posnemajoča kontrolna skupina ni potrebna, se lahko uporabi netretirana kontrolna skupina.

Dan 6-8 in 13–15 – tretirana in kontrolna skupina

Na dan 6–8 in spet na dan 13–15 se na istem preskusnem območju (po potrebi obritem) opravi enak nanos kakor na dan 0.

1.5.2.3.2 Provokacija

Dan 27–29 – tretirana in kontrolna skupina

Z netretiranega boka tretiranih in kontrolnih živali se odstrani dlaka (na kratko ostrižena). Na zadnji del netretiranega boka tretiranih in kontrolnih živali se nanese okluzivni obliž ali gaza, vsebujoča ustrezno količino preskusne snovi pri najvišji koncentraciji, ki še ne povzroča draženj a.

Če je primerno, se okluzivni obliž ali gaza, ki vsebuje samo nosilec, nanese tudi na sprednji netretirani bok tretiranih in tudi kontrolnih živali. Obliže ali gaze je treba z ustreznim povojem držati v stiku s kožo 6 ur.

1.5.2.3.3 Opazovanje in ocenjevanje

— približno 21 ur po odstranitvi obliža je treba s provokacijskega območja odstraniti dlako,

— približno 3 ure pozneje (približno 30 ur po nanosu provokacij skega obliža) se opazujejo in zabeležijo reakcije kože glede na ocene, prikazane v dodatku,

— približno 24 ur po 30-urnem opazovanju (približno 54 ur po nanosu provokacijskega obliža) se kožne reakcije spet opazujejo in zabeležijo.

Spodbuja se hitro čekiranje preskusnih in kontrolnih živali.

Če je treba razjasniti rezultate, pridobljene v prvi provokaciji, je treba preučiti možnost za izvedbo druge provokacije (t. j. ponovne provokacije), kjer je primerno, z novo kontrolno skupino, približno teden dni po prvi provokaciji. Ponovna provokacij a se lahko izvede tudi na prvotni kontrolni skupini.

▼B

Vse kožne reakcije in kakršne koli nenavadne izsledke, vključno s sistemskimi reakcijami, ki so posledica indukcije in postopkov provokacij e, je treba opazovati in zabeležiti v skladu z ocenjevalno lestvico po Magnussonu/Kligmanu (glej dodatek). Za razjasnitev dvomljivih reakcij se lahko opravijo tudi drugi postopki, npr. histopatološka raziskava ali meritev debeline kožne gube.

2. **PODATKI (GPMT in Buehlerjev preskus)**

Vse podatke je treba povzeti v obliki tabele, ki za vsako posamezno žival prikazuje kožne reakcije pri posameznih opazovanjih.

3. **POROČANJE (GPMT in Buehlerjev preskus)**

Če je bila pred preskusom na morskem prašičku opravljena izločilna analiza, se mora predložiti opis ali napotitev k preskusu (npr. lokalna analiza limfnih vozlov (LLNA), preskus otekanja ušesa pri miših (MEST)), vključno s podrobnimi podatki o postopku, skupaj z rezultati, ki so bili pridobljeni s preskusnimi in referenčnimi snovmi.

Poročilo o preskusu (GPMT in Buehlerjev preskus)

Če je mogoče, poročilo o preskusu vključuje naslednje informacije:

Poskusne živali:

— sev uporabljenih morskih prašičkov,

— število, starost in spol živali,

— izvor, nastanitveni pogoji, hrana itd.,

— teža vsake živali na začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— tehnika priprave območja nanosa obliža,

— podrobnosti o uporabljenih materialih ter tehniki priprave in nanosa obliža,

— rezultat pilotne študije z izsledki o indukcijskih in provokacijskih koncentracijah, ki bodo uporabljene v preskusu,

— podrobnosti o pripravi preskusne snovi, nanosu in odstranitvi,

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca,

— koncentracije nosilca in preskusne snovi, uporabljene za indukcijsko in provokacijsko izpostavljenost, ter skupna količina snovi, ki je bila nanesena za indukcijo in provokacijo.

Rezultati:

— povzetek rezultatov zadnjega pregleda občutljivosti in zanesljivosti (glej 1.3), vključno z informacijami o snovi, koncentraciji in uporabljenem nosilcu,

▼B

— opazovanja, opravljena na posameznih živalih, vključno s sistemom ocenjevanja,

— podroben opis narave in stopnje opaženih učinkov,

— kakršni koli histopatološki izsledki.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

4. **SKLICEVANJE**

Ta metoda je skladna s smernicami za preskušanje OECD 406.

▼B

Dodatek

TABELA

Ocenjevalna lestvica po Magnussonu/Kligmanu za ocenjevanje reakcij pri provokacijskem preskusu z obliži

0 = ni vidnih znakov

1 = diskreten ali neenakomeren eritem

2 = zmeren in zlit eritem

3 = intenziven eritem in oteklina

▼M4

B.7 28-DNEVNA ŠTUDIJA ORALNE STRUPENOSTI S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI NA GLODAVCIH

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD 407 (2008). Prvotna Smernica za preskušanje 407 je bila sprejeta leta 1981. Leta 1995 je bila sprejeta revidirana različica, da bi se z živalmi, uporabljenimi v študiji, pridobile dodatne informacije, zlasti o nevrotoksičnosti in imunotoksičnosti.

2. OECD se je leta 1998 lotila prednostne naloge revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih povzročiteljev endokrinih motenj (8). Eden od elementov te naloge je bil posodobitev obstoječe smernice OECD za „28-dnevno študijo oralne strupenosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih“ (TG 407) s parametri, ki so primerni za odkrivanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Ta postopek je bil predmet obsežnega mednarodnega programa za preskušanje pomena in uporabnosti dodatnih parametrov, učinkovitosti teh parametrov pri kemikalijah z (anti)estrogenim, (anti)androgenim in (proti)ščitničnim delovanjem, ponovljivosti v enem ali več laboratorijih ter interference novih parametrov s parametri, zahtevanimi v prejšnji smernici TG 407. Velika količina podatkov, ki je bila pri tem pridobljena, je bila zbrana in podrobno ocenjena v izčrpnem poročilu OECD (9). Ta posodobljena preskusna metoda B.7 (ki ustreza smernici TG 407) je plod izkušenj in rezultatov, pridobljenih med mednarodnim preskusnim programom. Z njo se lahko nekateri z endokrinim sistemom posredovani učinki obravnavajo skupaj z drugimi toksikološkimi učinki.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Pri ocenjevanju in vrednotenju strupenih lastnosti kemikalije se lahko metoda s ponavljanjem odmerkov uporabi za določitev oralne strupenosti, potem ko se s preskusi akutne strupenosti že pridobijo začetne informacije o strupenosti. Cilj te preskusne metode je preučiti učinke na zelo različne možne tarče strupenosti. Z njo se pridobivajo informacije o možnih nevarnostih za zdravje, ki lahko nastanejo pri ponavljajoči se izpostavljenosti v razmeroma omejenem obdobju, vključno z učinki na živčni, imunski in endokrini sistem. V zvezi s temi končnimi točkami bi se s to metodo morale identificirati kemikalije, ki imajo nevrotoksični potencial, zaradi katerega je morda upravičena dodatna poglobljena raziskava tega vidika, in kemikalije, ki vplivajo na fiziologijo ščitnice. Z njo se lahko pridobijo tudi podatki o kemikalijah, ki vplivajo na razmnoževalne organe mladih odraslih živali moškega in/ali ženskega spola, nakaže pa lahko tudi imunološke učinke.

4. Rezultate te preskusne metode B.7 je treba uporabiti za opredeljevanje nevarnosti in oceno tveganja. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati ob upoštevanju dokumenta OECD z naslovom „Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (11). Metoda obsega osnovno študijo strupenosti s ponavljajočimi se odmerki, ki se lahko uporabi za kemikalije, za katere ni upravičena 90-dnevna študija (npr. če obseg proizvodnje ne presega določenih mej), ali kot predhodna študija za dolgoročno študijo. Izpostavljenost mora trajati 28 dni.

▼M4

5. Mednarodni program za validacijo parametrov, primernih za morebitno odkrivanje endokrinega delovanja preskusne kemikalije, je pokazal, da je kakovost podatkov, pridobljenih s to preskusno metodo B.7, precej odvisna od izkušenj preskuševalnega laboratorija. To se nanaša zlasti na histopatološko odkrivanje cikličnih sprememb pri razmnoževalnih organih samic ali določanje teže malih, hormonsko odvisnih organov, ki jih je težko secirati. Napotki o histopatologiji so bili pripravljeni (19). Na voljo so na javni spletni strani OECD s smernicami za preskušanje. Njihov namen je pomagati patologom pri preiskavah in pripomoči k povečanju občutljivosti analize. V to preskusno metodo je bilo vključenih več parametrov, za katere je bilo ugotovljeno, da so kazalniki endokrine strupenosti. Parametri, za katere ni bilo na voljo dovolj podatkov, ki bi dokazovali njihovo uporabnost, ali za katere se je v validacijskem programu izkazalo, da je njihova zmožnost odkrivanja povzročiteljev endokrinih motenj slaba, so predlagani kot neobvezne končne točke (glej Dodatek 2).

6. Glede na podatke, pridobljene v validacijskem postopku, je treba poudariti, da ta analiza ni dovolj občutljiva za identifikacijo vseh snovi z (anti)androgenim ali (anti)estrogenim načinom delovanja (9). Ta preskusna metoda se ne izvaja v fazi življenja, ki je najbolj občutljiva za endokrine motnje. Kljub temu pa so bile pri tej preskusni metodi med validacijskim postopkom identificirane snovi, ki šibko in močno vplivajo na delovanje ščitnice, ter snovi z močnim in zmernim endokrinim delovanjem, ki delujejo prek estrogenih ali androgenih receptorjev, v le redkih primerih pa so bile identificirane snovi z endokrinim delovanjem, ki šibko vplivajo na estrogene ali androgene receptorje. Zato te metode ni mogoče opisati kot presejalno analizo za endokrino delovanje.

7. Neobstoj učinkov, povezanih s temi načini delovanja, se zato ne sme obravnavati kot dokaz o neobstoju učinkov na endokrini sistem. Kar zadeva z endokrinim sistemom posredovane učinke, se snovi torej ne smejo opredeliti samo na podlagi rezultatov te preskusne metode, temveč je treba za označitev potencialnega endokrinega delovanja uporabiti pristop, ki temelji na zanesljivosti dokazov in vključuje vse obstoječe podatke o kemikaliji. Zato mora sprejetje regulativne odločitve o endokrinem delovanju (opredelitev snovi) temeljiti na široko zasnovanem pristopu, in ne samo na rezultatih te preskusne metode.

8. Priznano je, da morajo vsi postopki z živalmi izpolnjevati lokalne standarde, ki veljajo za oskrbo živali; spodaj opisana oskrba živali in ravnanje z njimi pomenita minimalne standarde izvajanja, nad katerimi prevladajo lokalni predpisi, če so strožji. OECD je določila dodatne napotke o humanem ravnanju z živalmi (14).

9. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

10. Preskusna kemikalija se dnevno v stopnjevanih odmerkih oralno daje več skupinam preskusnih živali, in sicer po ena velikost odmerka na skupino v obdobju 28 dni. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so evtanazirane, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se preživele živali evtanazirajo, nato pa se na njih opravi

▼M4

obdukcija. Z 28-dnevno študijo se pridobijo informacije o učinkih ponavljajoče se oralne izpostavljenosti, poleg tega pa lahko ta študija nakaže potrebo po dodatnih dolgoročnejših študijah. Prav tako lahko pomaga pridobiti informacije o izbiri koncentracij za dolgoročnejše študije. S podatki, pridobljenimi na podlagi preskusne metode, mora biti mogoče opredeliti strupenost preskusne kemikalije, nakazati razmerje med odmerkom in odzivom ter določiti raven brez opaženih škodljivih učinkov (NOAEL).

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

11. Priporočena vrsta glodavca je podgana, čeprav se lahko uporabijo tudi druge vrste glodavcev. Če se parametri, določeni pri tej preskusni metodi B.7, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. Čeprav je biološko verjetno, da se druge vrste na strupene snovi odzivajo podobno kot podgane, je pri manjših vrstah mogoča večja spremenljivost zaradi tehničnih izzivov pri seciranju manjših organov. V mednarodnem validacijskem programu za odkrivanje povzročiteljev endokrinih motenj je bila podgana edina uporabljena vrsta. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje. Odmerke je treba začeti dajati čim prej po odstavitvi od sesanja, vsekakor pa preden so živali stare 9 tednov. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati ± 20 % povprečne teže za vsak spol. Če se študija s ponavljajočimi se oralnimi odmerki izvaja kot predhodna študija dolgoročnejše študije, je zaželeno, da se v obeh študijah uporabijo živali istega seva in istega izvora.

Nastanitev in hranjenje

12. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura prostora s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, mora biti cilj 50- do 60-odstotna vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna s fotoperiodo 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali.

13. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

Priprava živali

14. Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi položaja kletk čim manjši. Živali se označijo z edinstvenimi oznakami in so pred začetkom tretiranja najmanj pet dni v kletkah, da se prilagodijo laboratorijskim razmeram.

Priprava odmerkov

15. Preskusna kemikalija se daje z gavažo ali s hrano ali pitno vodo. Metoda oralnega dajanja odmerkov je odvisna od namena študije in fizikalnih/kemijskih/toksikokinetičnih lastnosti preskusne kemikalije.

▼M4

16. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/suspenzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih nosilcih. Pri nevodnih nosilcih morajo biti strupene lastnosti nosilca znane. Določiti je treba stabilnost preskusne kemikalije v nosilcu.

POSTOPEK

Število in spol živali

17. Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti vsaj 10 živali (pet samic in pet samcev). Če je načrtovana evtanazija med študijo, je treba to število povečati za toliko živali, kolikor se jih namerava evtanazirati pred zaključkom študije. Razmisliti je treba o dodatni satelitski skupini desetih živali (pet vsakega spola) v kontrolni skupini in skupini, tretirani z največjim odmerkom, na katerih bi se vsaj 14 dni po tretiranju opazovalo reverzibilnost, obstojnost ali zapoznelost nastopa strupenih učinkov.

Odmerjanje

18. Na splošno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in kontrolno skupino, če pa se na podlagi ocene drugih podatkov pri odmerku 1 000 mg/kg telesne teže/dan učinki ne pričakujejo, se lahko izvede mejni preskus. Če ustrezni podatki niso na voljo, se lahko opravi študija za ugotavljanje območja (na živalih istega seva in izvora), s pomočjo katere se določijo odmerki, ki bodo uporabljeni. Z živalmi v kontrolni skupini je treba ravnati enako kot z živalmi v preskusni skupini, le da niso deležne tretiranja s preskusno kemikalijo. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja nosilec, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino nosilca.

19. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse podatke o strupenosti in (toksiko)kinetične podatke, ki so na voljo za preskusno kemikalijo ali sorodne kemikalije. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, da se povzročijo strupeni učinki, ne pa tudi smrt ali hudo trpljenje. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od velikosti odmerka, in ugotovi najmanjša velikost odmerka, pri kateri ni opaženih škodljivih učinkov (NOAEL). Za določanje padajočih velikosti odmerkov je velikokrat najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerki pa je pogosto primerneje dodati 4. preskusno skupino.

20. Če se ugotovijo splošna strupenost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na imunske, nevrološke ali endokrine občutljive končne točke.

Mejni preskus

21. Če preskus pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo (na podlagi telesne teže), pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne povzroči opaznih strupenih učinkov in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih kemikalijah strupenost ni pričakovana, popolna študija s tremi velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega odmerka.

▼M4

Dajanje odmerkov

22. Preskusna kemikalija se daje živalim vsak dan 7 dni na teden v obdobju 28 dni. Če se preskusna kemikalija živalim daje z gavažo, jo je treba dajati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne cevke ali ustrezne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih ali jedkih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.

23. Pri kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalen vnos hrane ali porabo vode. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih ustrezno prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali. Če se študija s ponavljajočimi se odmerki izvaja kot predhodna študija dolgoročne študije, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

Opazovanja

24. Obdobje opazovanja mora trajati 28 dni. Živali iz satelitske skupine, ki so bile izbrane za opazovanja po koncu tretiranja, je treba pustiti vsaj 14 dni brez kakršnega koli tretiranja, da se odkrije zapoznel nastop, obstojnost ali izginotje strupenih učinkov.

25. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Podatke o zdravstvenem stanju živali je treba zabeležiti. Živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti.

26. Enkrat pred prvo izpostavljenostjo (za omogočanje primerjav na istem osebku) in nato vsaj enkrat na teden je treba opraviti natančna klinična opazovanja vseh živali. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj kletk, v katerih živali bivajo, na standardnem mestu in po možnosti vedno ob istem času. Opažanja je treba skrbno zabeležiti, po možnosti z uporabo sistemov točkovanja, ki jih izrecno določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da se preskusni pogoji čim manj spreminjajo in da opazovanja po možnosti opravijo opazovalci, ki s tretiranjem niso seznanjeni. Pozornost je med drugim treba nameniti vsem spremembam na koži, kožuhu, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenju, piloerekciji, velikosti zenic, nenavadnemu vzorcu dihanja). Prav tako je treba zabeležiti spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipij (npr. prekomernega čiščenja, ponavljajočega se vrtenja v krogu) ali nenormalnega vedenja (npr. samopohabe, vzvratne hoje) (2).

27. V četrtem tednu izpostavljenosti je treba oceniti senzorične reakcije na različne vrste dražljajev (2) (npr. slušne, vidne in proprioceptivne dražljaje) (3) (4) (5), moč oprijema (6) in motorično aktivnost (7). Nadaljnje podrobnosti glede možnih postopkov so na voljo v navedenih virih. Uporabiti je mogoče tudi druge postopke, ki niso opisani v navedenih virih.

▼M4

28. Funkcionalna opazovanja, ki se izvajajo v četrtem tednu izpostavljenosti, se lahko izpustijo, če se študija izvaja kot predhodna študija poznejše (90-dnevne) študije subkronične strupenosti. V takem primeru je treba funkcionalna opazovanja vključiti v to dopolnilno študijo. Po drugi strani pa lahko podatki o funkcionalnih opazovanjih, pridobljeni v študiji s ponavljajočimi se odmerki, pomagajo pri določanju velikosti odmerkov za poznejšo študijo subkronične strupenosti.

29. Izjemoma se lahko funkcionalna opazovanja izpustijo tudi za skupine, ki sicer kažejo znake zastrupitve v tolikšnem obsegu, da bi to močno oviralo izvedbo funkcionalnega preskusa.

30. Pri obdukciji se lahko z vaginalnim brisom določi cikel estrusa vseh samic (ni obvezno). Ta opazovanja zagotovijo informacije o fazi cikla estrusa ob žrtvovanju in pomagajo pri histološki oceni tkiv, občutljivih na estrogen (glej napotke o histopatologiji (19)).

Telesna teža in poraba hrane/vode

31. Vse živali je treba stehtati vsaj enkrat na teden. Porabo hrane je treba meriti najmanj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti tudi porabo vode.

Hematologija

32. Ob koncu preskusnega obdobja je treba opraviti naslednje hematološke preiskave: hematokrit, koncentracija hemoglobina, število eritrocitov, retikulociti, skupno in diferencialno število levkocitov, število trombocitov ter čas/zmožnost koagulacije. Druge preiskave, ki jih je treba opraviti, če imajo preskusna kemikalija ali njeni domnevni metaboliti oksidativne lastnosti oziroma če obstaja sum, da jih imajo, vključujejo koncentracijo methemoglobina in Heinzeva telesca.

33. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim in jih hraniti v ustreznih pogojih. Živali je treba pred evtanazijo čez noč postiti ([1]).

Klinična biokemija

34. Klinične biokemične preiskave za ugotavljanje glavnih strupenih učinkov na tkiva, zlasti na ledvice in jetra, je treba opraviti na vzorcih krvi, ki so bili vsem živalim odvzeti neposredno pred postopkom njihove evtanazije ali med njim (razen živalim, ki so bile najdene umirajoče in/ali so bile evtanazirane pred koncem študije). Preiskave plazme ali seruma vključujejo določanje natrija, kalija, glukoze, skupnega holesterola, sečnine, kreatinina, skupnih beljakovin in albumina, najmanj dveh encimov, ki sta kazalnika hepatoceličnih učinkov (kot so alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, alkalna fosfataza, γ-glutamil transpeptidaza in glutamat-dehidrogenaza), ter žolčnih kislin. Meritve dodatnih encimov (jetrnega ali drugega izvora) in bilirubina lahko v nekaterih okoliščinah zagotovijo koristne informacije.

35. Po izbiri se lahko v zadnjem tednu študije izvedejo naslednje analize urina, dobljenega z zbiranjem v določenih časovnih obdobjih: videz, količina, osmolalnost ali specifična teža, pH, beljakovine, glukoza in kri/krvne celice.

([1]) Za številne preiskave seruma in plazme, zlasti za določanje glukoze, se priporoča postenje čez noč. Glavni razlog za to je, da bi povečana spremenljivost, ki bi se zagotovo pojavila, če se žival ne bi postila, lahko prikrila manj opazne učinke in otežila razlago. Po drugi strani pa lahko postenje čez noč spremeni splošni metabolizem živali in lahko zlasti pri študijah prehranjevanja povzroči motnje v dnevni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Če se uporabi postenje čez noč, je treba klinične biokemične preiskave izvesti po zaključku funkcionalnih opazovanj v četrtem tednu študije.

▼M4

36. Poleg tega je treba razmisliti o študijah za preiskovanje plazemskih ali serumskih označevalcev splošnih poškodb tkiva. Druge preiskave, ki jih je treba opraviti, če lahko znane lastnosti preskusne kemikalije vplivajo na povezane presnovne profile ali če obstaja sum, da lahko vplivajo nanje, vključujejo določanje kalcija, fosfatov, trigliceridov, posebnih hormonov in holinesteraze. Te je treba opredeliti pri kemikalijah določenih razredov oziroma za vsak primer posebej.

37. Čeprav v mednarodni oceni z endokrinim sistemom povezanih končnih točk ni bilo mogoče dokazati nedvomne koristi določanja ščitničnih hormonov (T3 in T4) in TSH, je lahko koristno obdržati vzorce plazme ali seruma za merjenje T3, T4 in TSH (ni obvezno), če obstaja znak o učinku na hipofizno-ščitnično os. Ti vzorci se lahko hranijo zamrznjeni pri –20 °C. Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:

— čas žrtvovanja zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva,

— način žrtvovanja, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov,

— preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.

Dokončno identifikacijo kemikalij, ki vplivajo na ščitnico, je zanesljiveje opraviti s histopatološko analizo kot z ravnmi hormonov.

38. Vzorce plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Priporočljivo je, da se razmisli o določanju ravni T3, T4 in TSH, sproženih s histopatološkimi spremembami ščitnice. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne. Zato morda ne bo mogoče določiti izvedbenih meril, ki temeljijo na enotnih preteklih podatkih. Druga možnost pa je, da si laboratoriji prizadevajo za kontrolne koeficiente variacije, ki so nižji od 25 za T3 in T4 ter nižji od 35 za TSH. Vse koncentracije morajo biti zabeležene v ng/ml.

39. Če pretekli izhodiščni podatki niso ustrezni, je treba razmisliti o določitvi hematoloških in kliničnih biokemičnih spremenljivk pred začetkom dajanja odmerkov ali po možnosti pri sklopu živali, ki niso vključene v preskusne skupine.

PATOLOGIJA

Makroskopska obdukcija

40. Na vseh živalih v študiji se opravi popolna in natančna makroskopska obdukcija, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Z jeter, ledvic, nadledvičnih žlez, mod, nadmodka, prostate in semenskih mešičkov s celotnimi koagulacijskimi žlezami, priželjca, vranice, možganov in srca vseh živali (razen živali, ki so bile najdene umirajoče in/ali so bile evtanazirane pred koncem študije) je treba, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato izmeriti njihovo mokro težo čim prej po disekciji, da se ne izsušijo. Pri prostati in vseh delih, ki spadajo k njej, je potrebna previdnost pri odstranjevanju priraščenih tkiv, da se ne prebodejo semenski mešički, ki so napolnjeni s tekočino. Lahko pa se semenski mešički in prostata obrežejo in stehtajo po fiksaciji.

▼M4

41. Poleg tega se lahko čim prej po disekciji, da se ne izsušita, stehtata tudi naslednji tkivi: oba jajčnika (mokra teža) in maternica, vključno z vratom (napotki za odstranitev in pripravo materničnih tkiv za tehtanje so na voljo v OECD TG 440 (18)).

42. Teža ščitnice (ni obvezno) se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo.

43. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo (glej odstavek 47): vse vidne lezije, možgane (reprezentativne regije, vključno z velikimi in malimi možgani ter mostom), hrbtenjačo, oko, želodec, tanko in debelo črevo (vključno s Peyerjevimi ploščami), jetra, ledvice, nadledvične žleze, vranico, srce, priželjc, ščitnico, sapnik in pljuča (shranijo se tako, da se napihnejo s fiksativom in nato potopijo), spolne žleze (moda in jajčnike), pomožne spolne organe (maternico in vrat, nadmodek, prostato in semenske mešičke s koagulacijskimi žlezami), vagino, sečni mehur, bezgavke (poleg najbližje drenažne bezgavke je treba vzeti še eno bezgavko v skladu z izkušnjami laboratorija (15)), periferni živec (ishiadični ali tibialni), po možnosti v neposredni bližini mišice, skeletno mišico in kost s kostnim mozgom (rezina ali sveže prepariran punktat kostnega mozga). Priporočljivo je, da se moda fiksirajo s potopitvijo v Bouinov ali prilagojen Davidsonov fiksativ (16) (17). *Tunico albugineo* je treba nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije.

44. Z naslednjimi tkivi je mogoče pridobiti koristne informacije o endokrinih učinkih: spolnimi žlezami (jajčniki in modi), pomožnimi spolnimi organi (maternico, vključno z vratom, nadmodkom, semenskimi mešički s koagulacijskimi žlezami ter dorzolateralno in ventralno prostato), vagino, hipofizo, mlečno žlezo samcev, ščitnico in nadledvično žlezo. Spremembe v mlečnih žlezah samcev niso bile zadostno dokumentirane, vendar je lahko ta parameter zelo občutljiv za snovi z estrogenim delovanjem. Opazovanja organov/tkiv, ki niso našteti v odstavku 43, niso obvezna (glej Dodatek 2).

45. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih o histopatologiji (19).

46. V mednarodnem preskusnem programu je bilo pridobljenih nekaj dokazov, da se lahko manj opazni endokrini učinki kemikalij z majhno zmožnostjo za vplivanje na homeostazo spolnih hormonov lažje odkrijejo z motnjami sinhronizacije cikla estrusa v različnih tkivih kot z očitnimi histopatološkimi spremembami spolnih organov samic. Čeprav ni dokončnega dokaza o takih učinkih, je priporočljivo, da se dokazi o možni asinhronosti cikla estrusa upoštevajo pri razlagi histopatologije jajčnikov (folikularne celice ter celice teke in granuloze), maternice, materničnega vratu in vagine. V to primerjavo se lahko, če se ocenjuje, vključi tudi faza cikla, ugotovljena z vaginalnimi brisi.

▼M4

Histopatologija

47. Popolno histopatološko preiskavo je treba opraviti na shranjenih organih in tkivih vseh živali iz kontrolne skupine ter živali iz skupine, tretirane z velikim odmerkom. Te preiskave je treba razširiti na živali iz skupin, tretiranih z vsemi drugimi odmerki, če se v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opazijo spremembe, povezane s tretiranjem.

48. Pregledati je treba vse vidne lezije.

49. Če se uporablja satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so bili opaženi učinki v tretiranih skupinah.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

50. Podatke je treba navesti za vsako žival. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navede število živali na začetku preskusa, število živali, ki so bile med preskusom najdene poginule ali so bile evtanazirane iz humanih razlogov, in čas vsake smrti ali evtanazije, število živali, ki kažejo znake zastrupitve, opis opaženih znakov zastrupitve, vključno s časom njihovega nastopa, trajanjem in resnostjo vseh strupenih učinkov, število živali, pri katerih so opažene lezije, vrste lezij in njihova resnost ter odstotek živali, pri katerih je opažena posamezna vrsta lezije.

51. Če je mogoče, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Pri primerjavah učinka vzdolž odmernega območja se je treba izogibati večkratnim preskusom t. Statistične metode je treba izbrati med zasnovo študije.

52. Za nadzor kakovosti se predlaga zbiranje preteklih kontrolnih podatkov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z odkrivanjem povzročiteljev endokrinih motenj. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se ocenjujejo aktualne študije.

Poročilo o preskusu

53. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijske podatke.

Nosilec (če je ustrezno)

— utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

Preskusne živali

— uporabljeno vrsta/sev,

— število, starost in spol živali,

— vir, nastanitvene pogoje, hrano itd.,

— težo vsake živali na začetku preskusa,

— utemeljitev vrste, če to ni podgana.

Preskusni pogoji

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov,

— podatke o formulaciji preskusne kemikalije/pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka,

▼**M4**

— podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

Neobvezne končne točke, ki se preiskujejo

— seznam neobveznih končnih točk, ki se preiskujejo.

Rezultati

— telesno težo/spremembe telesne teže,

— porabo hrane in, če je ustrezno, porabo vode,

— podatke o toksičnih reakcijah glede na spol in velikosti odmerka, vključno z znaki zastrupitve,

— vrsto, resnost in trajanje kliničnih opažanj (ali so reverzibilna ali ne),

— ocene senzorične aktivnosti, moči oprijema in motorične aktivnosti,

— hematološke preskuse z ustreznimi referenčnimi vrednostmi,

— klinične biokemijske preskuse z ustreznimi referenčnimi vrednostmi,

— telesno težo ob evtanaziji in podatke o teži organov,

— izsledke obdukcije,

— podroben opis vseh ugotovitev histopatoloških preiskav,

— podatke o absorpciji, če so na voljo,

— statistično obdelavo rezultatov, kjer je to primerno.

Razprava o rezultatih.

Sklepi.

▼M4

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17 β-estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. T_3) v sesalskem organizmu.

Odmerjanje je splošni izraz, ki obsega odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Očitna strupenost je splošni izraz, ki opisuje jasne znake zastrupitve po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zadostovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov zastrupitve in verjetno smrt.

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (*no-observed-adverse-effect level*). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogeni hormon (npr. 17 β-estradiola) v sesalskem organizmu.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. T_3) v sesalskem organizmu.

Validacija je znanstveni proces, s katerim se določijo delovne zahteve in omejitve preskusne metode ter pokažeta njena zanesljivost in ustreznost za določeni namen.

▼M4

Dodatek 2

Končne točke, priporočene za odkrivanje povzročiteljev endokrinih motenj v tej preskusni metodi B.7

Obvezne končne točke	Neobvezne končne točke
Teža	
— moda	— jajčniki
— nadmodek	— maternica, vključno z vratom
— nadledvične žleze	— ščitnica
— prostata in semenski mešički s koagulacijskimi žlezami	
Histopatologija	
— spolne žleze:	— vaginalni brisi
— moda in	— mlečne žleze samcev
— jajčniki	— hipofiza
— pomožni spolni organi:	
— nadmodek	
— prostata in semenski mešički s koagulacijskimi žlezami	
— maternica, vključno z vratom	
— nadledvične žleze	
— ščitnica	
— vagina	
Meritve hormonov	
	— raven T3 in T4 v obtoku
	— raven TSH v obtoku

VIRI:

(1) OECD (Pariz, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria. Dokument št. 60.

(3) Tupper, D. E., Wallace R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

(4) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

(5) Moser, V. C., McDaniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

(6) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼M4

(7) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. marec 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html.

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley, P., Perry, R., Ennulat, D., Frame, S., Johnson, C., Lapointe, J.-M., Nyska, A., Snyder, P. W., Walker, D., Walter, G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

(16) Hess, R. A., Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin, R. E., in Heindel, J. J. (ur.). Academic Press: San Diego, Kalifornija, str. 52–85.

(17) Latendresse, J. R., Warbrittion, A. R., Jonassen, H., Creasy, D. M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8 SUBAKUTNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU: 28-DNEVNA ŠTUDIJA

POVZETEK

Ta revidirana preskusna metoda B.8 je bila zasnovana za celovito opredelitev strupenosti preskusne kemikalije pri vdihavanju po ponavljajoči se izpostavljenosti v omejenem časovnem obdobju (28 dni) in zagotavljanje podatkov za kvantitativne ocene tveganja pri vdihavanju. Skupine najmanj 5 samcev in 5 samic glodavcev se 28 dni po 6 ur na dan izpostavljajo a) trem ali več različnim koncentracijam preskusne kemikalije, b) filtriranemu zraku (negativna kontrola) in/ali c) nosilcu (kontrola z nosilcem). Navadno se živali izpostavljajo 5 dni na teden, dovoljeno pa je tudi izpostavljanje 7 dni na teden. Vedno se preskušajo samci in samice, vendar se lahko izpostavljajo različnim koncentracijam, če je znano, da je en spol občutljivejši na določeno preskusno kemikalijo. Ta metoda vodji študije omogoča prožnost za vključitev satelitskih skupin (skupin za reverzibilnost), bronhoalveolarne lavaže (BAL), nevroloških preskusov ter dodatnih kliničnih patoloških in histopatoloških ocen, da se bolje opredeli strupenost preskusne kemikalije.

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD 412 (2009). Prvotna smernica za preskušanje 412 v zvezi s subakutno strupenostjo pri vdihavanju (TG 412) je bila sprejeta leta 1981 (1). Ta preskusna metoda B.8 (ki ustreza revidirani TG 412) je bila posodobljena, da upošteva trenutno stanje v znanosti ter izpolnjuje sedanje in prihodnje zakonodajne potrebe.

2. Ta metoda omogoča opredeljevanje škodljivih učinkov po ponavljajoči se dnevni izpostavljenosti preskusni kemikaliji z vdihavanjem, pri čemer preskušanje traja 28 dni. Podatki, pridobljeni z 28-dnevnimi študijami subakutne strupenosti pri vdihavanju, se lahko uporabljajo za kvantitativne ocene tveganja (če taki študiji ne sledi 90-dnevna študija subkronične strupenosti pri vdihavanju (poglavje B.29 te priloge)). Ti podatki lahko tudi zagotovijo informacije o izbiri koncentracij za dolgoročnejše študije, kot je 90-dnevna študija subkronične strupenosti pri vdihavanju. Ta preskusna metoda ni posebej namenjena preskušanju nanomaterialov. Pojmi, ki se uporabljajo v okviru te preskusne metode, so opredeljeni na koncu tega poglavja in v Dokumentu s smernicami št. 39 (2).

ZAČETNI PREUDARKI

3. Da se poveča kakovost študije in kar najbolj zmanjša uporaba živali, mora preskuševalni laboratorij pred izvedbo študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji. Informacije, ki pomagajo pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij, lahko vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah ter podatke, pridobljene s preskušanjem akutne strupenosti pri vdihavanju. Če se med študijo pričakuje ali opazi nevrotoksičnost, se lahko vodja študije odloči vključiti ustrezne ocene, kot sta sklop funkcionalnih opazovanj (FOB) in merjenje motorične aktivnosti. Čeprav je lahko čas izpostavitve odločilen za posebne preglede, izvajanje teh dodatnih dejavnosti ne sme posegati v osnovno zasnovo študije.

▼M4

4. Razredčine jedkih ali dražilnih preskusnih kemikalij se lahko preskušajo pri koncentracijah, ki bodo zagotovile želeno stopnjo strupenosti (glej GD 39 (2)). Pri izpostavljanju živali tem snovem morajo biti ciljne koncentracije dovolj nizke, da ne povzročijo očitnih bolečin in trpljenja, vendar zadostne za razširitev krivulje koncentracija-odziv na ravni, ki izpolnjuje zakonodajni in znanstveni cilj preskusa. Te koncentracije je treba izbrati za vsak primer posebej, po možnosti na podlagi ustrezno zasnovane študije za ugotavljanje območja, s katero se pridobijo informacije o kritičnih končnih točkah, morebitnem pragu draženja in času nastopa (glej odstavke 11–13). Izbrane koncentracije je treba utemeljiti.

5. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo bolečine ali kažejo znake hudega in trajnega trpljenja, je treba humano usmrtiti. Umirajoče živali se upoštevajo enako kot tiste, ki so poginile med preskusom. Merila za sprejetje odločitve o usmrtitvi umirajočih živali ali živali, ki zelo trpijo, in napotki za prepoznavanje predvidljive ali neizbežne smrti so obravnavani v Dokumentu s smernicami OECD o humanih končnih točkah (3).

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

6. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle glodavce običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Najprimernejša vrsta je podgana. Uporabo drugih vrst je treba utemeljiti.

Priprava živali

7. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje. Na dan randomizacije morajo biti živali mladi odrasli primerki, ki so stari 7 do 9 tednov in katerih telesna teža ne odstopa za več kot ± 20 % od povprečne teže za vsak spol. Živali se naključno izberejo, označijo za posamično prepoznavanje in so pred začetkom preskusa najmanj 5 dni v kletkah, da se prilagodijo laboratorijskim razmeram.

Oskrba živali

8. Živali je treba posamično identificirati, po možnosti s podkožnimi transponderji, da se olajšajo opazovanja in prepreči zmeda. Temperatura v prostoru za oskrbo preskusnih živali mora biti 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, čeprav to morda ne bo mogoče, kadar se kot nosilec uporablja voda. Pred izpostavljanjem in po njem morajo biti živali v kletkah na splošno združene v skupine po spolu in koncentraciji, pri čemer število primerkov na kletko ne sme vplivati na neovirano opazovanje posamezne živali ter mora kar najbolj zmanjšati izgube zaradi kanibalizma in spopadov. Kadar bo izpostavljen samo nos živali, jih bo morda treba privajati na zadrževalne cevi. Te živalim ne smejo povzročati prevelikega fizičnega ali toplotnega stresa ali stresa zaradi imobilizacije. Omejevanje gibanja lahko vpliva na fiziološke končne točke, kot sta telesna temperatura (hipertermija) in/ali minutni dihalni volumen. Če so na voljo splošni podatki, ki kažejo, da se takih sprememb ne pojavi zelo veliko, predhodno prilagajanje zadrževalnim cevem ni potrebno. Živali, ki se izpostavijo aerosolu s celim telesom, morajo biti med izpostavljenostjo nastanjene posamično, da preskusnega aerosola ne morejo filtrirati preko kožuhov drugih primerkov v kletki. Razen med izpostavljenostjo se lahko uporablja običajna in potrjena laboratorijska hrana, ki jo spremlja neomejena količina pitne vode iz komunalnega omrežja. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe/12 ur teme.

▼M4

Inhalacijske komore

9. Pri izbiri inhalacijske komore je treba upoštevati lastnosti preskusne kemikalije in cilj preskusa. Po možnosti se kot način izpostavljenosti uporabi izpostavljenost nosu (imenovana tudi izpostavljenost glave ali smrčka). Izpostavljenost nosu je navadno najprimernejša za študije tekočih ali trdnih aerosolov ter za hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole. Mogoče je, da bo posebne cilje študije lažje doseči z izpostavljenostjo celega telesa, vendar je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. Kadar se uporablja komora za izpostavljenost celega telesa, skupni „volumen“ preskusnih živali ne sme presegati 5 % prostornine komore, da se zagotovi stabilnost atmosfere. Načela tehnik izpostavljanja nosu in celega telesa ter njune prednosti in pomanjkljivosti so obravnavani v GD 39 (2).

ŠTUDIJE STRUPENOSTI

Mejne koncentracije

10. V nasprotju s študijami akutne strupenosti, za 28-dnevne študije subakutne strupenosti pri vdihavanju ni opredeljenih mejnih koncentracij. Pri določanju najvišje koncentracije, ki bo preskušena, je treba upoštevati: 1. najvišjo dosegljivo koncentracijo, 2. stopnjo izpostavljenosti ljudi „v najslabšem primeru“, 3. potrebo po ohranjanju zadostne oskrbe s kisikom in/ali 4. preudarke v zvezi z dobrobitjo živali. Če ni mej, ki temeljijo na podatkih, se lahko uporabijo meje za akutno strupenost iz Uredbe (ES) št. 1272/2008 (13) (tj. do najvišje koncentracije 5 mg/l za aerosole, 20 mg/l za hlape in 20 000 ppm za pline) (glej GD 39 (2)). Če je treba pri preskušanju plinov ali lahko hlapnih preskusnih kemikalij (npr. hladil) te meje preseči, je to treba utemeljiti. Mejna koncentracija mora povzročiti nedvomno strupenost, ne da bi živalim povzročila nepotreben stres ali vplivala na njihovo življenjsko dobo (3).

Študija za ugotavljanje območja

11. Pred začetkom glavne študije je morda treba opraviti študijo za ugotavljanje območja. Ta je obsežnejša od opazovalne študije, saj ni omejena z izbiro koncentracij. Spoznanja, pridobljena v njej, lahko zagotovijo uspešnost glavne študije. S študijo za ugotavljanje območja se lahko na primer zagotovijo tehnične informacije o analitskih metodah, določanju velikosti delcev in odkrivanju mehanizmov strupenosti, klinični patološki in histopatološki podatki ter ocene, kolikšne so lahko koncentracije NOAEL in MTC v glavni študiji. Vodja študije se lahko študijo za ugotavljanje območja odloči uporabiti za določitev pragu draženja dihal (npr. s histopatološko preiskavo dihal, preskusom pljučne funkcije ali bronhoalveolarno lavažo), zgornje koncentracije, ki jo živali prenesejo brez nepotrebnega stresa, in parametrov, s katerimi bo mogoče najbolje opredeliti strupenost preskusne kemikalije.

12. Študija za ugotavljanje območja lahko zajema eno ali več koncentracij. Vsaki od njih se izpostavi največ tri samce in tri samice. Študija za ugotavljanje območja mora trajati vsaj 5 dni in običajno največ 14 dni. V poročilu o študiji je treba utemeljiti izbrane koncentracije za glavno študijo. Cilj glavne študije je dokazati razmerje koncentracija-odziv na podlagi pričakovanja o tem, katera bo najobčutljivejša končna točka. Nizka koncentracija mora biti po možnosti koncentracija brez opaznih škodljivih učinkov, medtem ko mora visoka koncentracija povzročiti nedvomne strupene učinke, ne da bi živalim povzročila nepotrebni stres ali vplivala na njihovo življenjsko dobo (3).

▼M4

13. Pri izbiri koncentracij za študijo za ugotavljanje območja je treba upoštevati vse razpoložljive informacije, vključno z razmerji struktura-aktivnost in podatki o podobnih kemikalijah (glej odstavek 3). S študijo za ugotavljanje območja se lahko potrdijo/zavrnejo pričakovanja o najobčutljivejših končnih točkah po mehanističnih merilih, npr. o inhibiciji holinesteraze z organofosfati, nastajanju methemoglobina zaradi eritrocitotoksičnih snovi, ščitničnih hormonih (T_3, T_4) v primeru tirotoksičnih snovi ter o beljakovinah, LDH ali nevtrofilcih pri bronhoalveolarni lavaži v primeru neškodljivih slabo topnih delcev ali aerosolov, ki dražijo pljuča.

Glavna študija

14. Glavna študija subakutne strupenosti običajno zajema tri različne koncentracije ter po potrebi tudi sočasno negativno kontrolo (z zrakom) in/ali kontrolo z nosilcem (glej odstavek 17). Pri izbiri primernih stopenj izpostavljenosti si je treba pomagati z vsemi razpoložljivimi podatki, vključno z rezultati študij sistemske strupenosti, presnovo in kinetiko (poseben poudarek je treba nameniti izogibanju visokim koncentracijam, ki nasitijo kinetične procese). Vsaka preskusna skupina vsebuje najmanj 10 glodavcev (5 samcev in 5 samic), ki se 4 tedne po 5 dni na teden 6 ur na dan izpostavljajo preskusni kemikaliji (skupno študija traja 28 dni). Živali se lahko izpostavljajo tudi 7 dni na teden (npr. pri preskušanju farmacevtskih izdelkov, ki se vdihavajo). Če je znano, da je en spol občutljivejši na določeno preskusno kemikalijo, se lahko spola izpostavljata različnim koncentracijam, da se zagotovi optimalen odziv na koncentracijo, kot je opisano v odstavku 15. Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljša obdobja izpostavljenosti prilagodijo, da se kar najbolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Kadar se uporabi obdobje izpostavljenosti, krajše od 6 ur/dan, ali kadar je treba opraviti študijo izpostavljenosti celega telesa z dolgimi obdobji (npr. 22 ur/dan), je treba to utemeljiti (glej GD 39 (2)). V obdobju izpostavljenosti je treba živalim odrekati hrano, razen če je to obdobje daljše od 6 ur. Med izpostavljenostjo celega telesa lahko živali ves čas uživajo vodo.

15. Z izbranimi ciljnimi koncentracijami je treba opredeliti ciljne organe in prikazati jasen odziv na koncentracijo:

— visoka koncentracija mora imeti strupene učinke, vendar ne sme povzročiti dolgotrajnih znakov ali smrtnosti, ki bi preprečili smiselno oceno,

— vmesne koncentracije morajo biti razporejene tako, da se doseže stopnjevanje med strupenimi učinki nizke in visoke koncentracije,

— nizka koncentracija mora povzročiti šibke znake strupenosti oziroma takih znakov ne sme povzročiti.

Satelitska študija (študija reverzibilnosti)

16. Satelitska študija (študija reverzibilnosti) se lahko uporabi za opazovanje reverzibilnosti, obstojnosti ali zapoznelega pojava zastrupitve v ustrezno dolgem obdobju po tretiranju, ki pa ne sme bili krajše od 14 dni. Satelitske skupine (skupine za reverzibilnost) so sestavljene iz petih samcev in petih samic, ki se izpostavijo sočasno s preskusnimi živalmi v glavni študiji. Skupine za satelitsko študijo (študijo reverzibilnosti) je treba preskusni kemikaliji izpostaviti pri najvišji koncentraciji, pri čemer se po potrebi uporabi sočasna kontrola z zrakom in/ali kontrola z nosilcem (glej odstavek 17).

▼M4

Kontrolne živali

17. Z živalmi za sočasno negativno kontrolo (z zrakom) je treba ravnati enako kot z živalmi v preskusni skupini, le da se namesto preskusni kemikaliji izpostavijo filtriranemu zraku. Kadar se za pomoč pri ustvarjanju preskusne atmosfere uporabi voda ali druga snov, je treba v študijo namesto negativne kontrolne skupine (z zrakom) vključiti kontrolno skupino z nosilcem. Če je le mogoče, je treba kot nosilec uporabiti vodo. Kadar se kot nosilec uporabi voda, morajo biti kontrolne živali izpostavljene zraku z enako relativno vlažnostjo kot pri preskusnih skupinah. Izbira ustreznega nosilca mora temeljiti na primerno izvedeni predhodni študiji ali preteklih podatkih. Če o strupenosti nosilca ni veliko znanega, se lahko vodja študije odloči uporabiti negativno kontrolo (z zrakom) in kontrolo z nosilcem, vendar se to močno odsvetuje. Kadar pretekli podatki razkrijejo, da nosilec ni strupen, negativna kontrolna skupina (z zrakom) ni potrebna in je treba uporabiti samo kontrolo z nosilcem. Če predhodna študija preskusne kemikalije, formulirane v nosilcu, ne pokaže strupenosti, iz tega sledi, da nosilec ni strupen pri preskušeni koncentraciji, tako da je treba uporabiti to kontrolo z nosilcem.

POGOJI IZPOSTAVLJENOSTI

Dajanje koncentracij

18. Živali se izpostavijo preskusni kemikaliji v obliki plina, hlapov, aerosola ali njihovih zmesi. Agregatno stanje, ki bo preskušeno, je odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, izbrane koncentracije in/ali fizikalne oblike, ki bo najverjetnejša med ravnanjem s preskusno kemikalijo in njeno uporabo. Higroskopne in kemično reaktivne preskusne kemikalije je treba preskušati v suhem ozračju. Paziti je treba, da se ne ustvarijo eksplozivne koncentracije. Za snov, ki jo tvorijo delci, se lahko zaradi zmanjšanja velikosti delcev uporabijo mehanski postopki. Več napotkov je na voljo v GD 39 (2).

Porazdelitev velikosti delcev

19. Za vse aerosole in hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole, je treba določiti velikost delcev. Da se omogoči izpostavljenost vseh ustreznih predelov dihal, so priporočeni aerosoli, katerih mediana porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) znaša 1–3 μm z geometričnim standardnim odklonom (σ_g) 1,5–3,0 (4). Prizadevanje za izpolnitev tega standarda naj bo razumno; če ga ni mogoče izpolniti, je treba zagotoviti strokovno presojo. Delci kovinskih hlapov so lahko na primer manjši od tega standarda, naelektreni delci in vlakna pa lahko presegajo navedene vrednosti.

Priprava preskusne kemikalije v nosilcu

20. Preskusno kemikalijo je treba po možnosti preskušati brez nosilca. Če je uporaba nosilca nujna za ustvarjanje primerne koncentracije in velikosti delcev preskusne kemikalije, je treba prednostno uporabiti vodo. Vedno, kadar se preskusna kemikalija raztopi v nosilcu, je treba dokazati njeno stabilnost.

SPREMLJANJE POGOJEV IZPOSTAVLJENOSTI

Pretok zraka v komori

21. Pretok zraka skozi komoro za izpostavljanje je treba med vsako izpostavljenostjo skrbno nadzorovati, stalno spremljati in zabeležiti najmanj vsako uro. Sprotno spremljanje koncentracije (ali časovne stabilnosti) preskusne atmosfere je meritev, ki je neločljivo povezana z vsemi dinamičnimi parametri in zagotavlja posredno sredstvo za nadzor nad vsemi pomembnimi dinamičnimi parametri vdihavanja. Če se koncentracija spremlja sproti, se lahko pogostnost merjenja pretoka zraka zmanjša na eno meritev na izpostavljenost na dan. Pri komorah za izpostavljanje nosu je treba posebno pozornost nameniti preprečevanju ponovnega vdihavanja. Koncentracija

▼M4

kisika mora znašati najmanj 19 %, koncentracija ogljikovega dioksida pa ne sme presegati 1 %. Če obstaja razlog za domnevo, da tega standarda ni mogoče izpolniti, je treba koncentraciji kisika in ogljikovega dioksida izmeriti. Če meritve prvi dan izpostavljenosti pokažejo, da sta ravni teh plinov ustrezni, nadaljnje merjenje ni potrebno.

Temperatura in relativna vlažnost v komori

22. Temperaturo v komori je treba ohranjati pri 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost v območju dihanja živali je treba pri izpostavljenosti nosu in izpostavljenosti celega telesa stalno spremljati ter jo med vsako izpostavljenostjo vsako uro zabeležiti, če je to mogoče. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, vendar je to lahko bodisi nedosegljivo (npr. pri preskušanju zmesi na vodni osnovi) bodisi nemerljivo zaradi interference preskusne kemikalije s preskusno metodo.

Preskusna kemikalija: nazivna koncentracija

23. Vedno, kadar je to izvedljivo, je treba izračunati in zabeležiti nazivno koncentracijo v komori za izpostavljanje. Nazivna koncentracija je masa ustvarjene preskusne kemikalije, deljena s skupnim volumnom zraka, ki preide skozi sistem inhalacijske komore. Nazivna koncentracija se ne uporablja za opredeljevanje izpostavljenosti živali, pač pa pri primerjavi z dejansko koncentracijo pokaže, kako učinkovito je ustvarjanje preskusnega sistema, in se torej lahko uporabi za odkrivanje težav pri ustvarjanju.

Preskusna kemikalija: dejanska koncentracija

24. Dejanska koncentracija je koncentracija preskusne kemikalije, vzorčena v območju dihanja živali v inhalacijski komori. Dejanske koncentracije se merijo s specifičnimi metodami (npr. z neposrednim vzorčenjem, adsorpcijskimi ali kemičnimi reaktivnimi metodami in naknadnim analitskim opredeljevanjem) ali nespecifičnimi metodami, kot je gravimetrična analiza s filtriranjem. Uporaba gravimetrične analize je sprejemljiva samo za enokomponentne prašne aerosole ali aerosole tekočin z majhno hlapnostjo ter jo je treba pred študijo podpreti z ustreznimi opredelitvami, specifičnimi za preskusno kemikalijo. Z gravimetrično analizo se lahko določi tudi koncentracija večkomponentnega prašnega aerosola, vendar so za to potrebni analitski podatki, ki kažejo, da je sestava snovi v zraku podobna začetni snovi. Če te informacije niso na voljo, bo morda treba med študijo znova analizirati preskusno kemikalijo (po možnosti takrat, ko lebdi v zraku) v rednih intervalih. Za aerosolizirane snovi, ki lahko izhlapijo ali sublimirajo, je treba prikazati, da so bile vse faze zbrane z izbrano metodo.

25. Po možnosti je treba v celotni študiji uporabljati eno serijo preskusne kemikalije, preskusni vzorec pa je treba hraniti v pogojih, v katerih se ohranjajo njegova čistost, homogenost in stabilnost. Pred začetkom študije je treba opredeliti lastnosti preskusne kemikalije, vključno z njeno čistostjo ter, če je to tehnično izvedljivo, identiteto in količinami ugotovljenih kontaminantov in nečistot. To se lahko med drugim prikaže z naslednjimi podatki: z retencijskim časom in relativno površino vrha, molekulsko maso, ugotovljeno na podlagi analiz z masno spektroskopijo ali plinsko kromatografijo, ali z drugimi ocenami. Čeprav identiteta preskusnega vzorca ni odgovornost preskuševalnega laboratorija, je morda smotrno, da ta vsaj delno potrdi naročnikovo opredelitev lastnosti (npr. barvo, agregatno stanje itd.).

▼M4

26. Atmosfera v komori za izpostavljanje mora biti konstantna, kolikor je to izvedljivo. Za dokazovanje stabilnosti pogojev izpostavljenosti se lahko uporabi naprava za sprotno spremljanje, kot je aerosolni fotometer za aerosole ali analizator skupnih ogljikovodikov za hlape. Dejansko koncentracijo v komori je treba izmeriti najmanj trikrat vsak dan izpostavljenosti za vsako stopnjo izpostavljenosti. Če to zaradi omejenih stopenj pretoka zraka ali nizkih koncentracij ni izvedljivo, zadostuje, da se v vsakem obdobju izpostavljenosti vzame le en vzorec. V tem primeru se vzorec po možnosti zbira prek celotnega obdobja izpostavljenosti. Posamezni vzorci koncentracije v komori lahko od srednje koncentracije v komori odstopajo za največ ± 10 % za pline in hlape oziroma za največ ± 20 % za tekoče ali trdne aerosole. Izračunati in zabeležiti je treba čas do vzpostavitve ravnotežja v komori (t_{95}). Čas izpostavljenosti pokriva čas ustvarjanja preskusne kemikalije. Pri tem sta upoštevana čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja v komori (t_{95}), in čas upadanja. Napotki za ocenjevanje t_{95} so na voljo v GD 39 (2).

27. Pri zelo kompleksnih zmeseh, sestavljenih iz plinov/hlapov in aerosolov (npr. zgorevalnih atmosfer in preskusnih kemikalij, potiskanih iz namenskih proizvodov/naprav za posebno uporabo), se lahko v inhalacijski komori vsaka faza obnaša drugače. Zato je treba za vsako fazo (plin/hlape in aerosol) izbrati najmanj eno indikatorsko snov (analit), navadno glavno aktivno snov v zmesi. Kadar je preskusna kemikalija zmes, je treba analitsko koncentracijo navesti za celotno zmes in ne le za aktivno sestavino ali indikatorsko snov (analit). Dodatne informacije o dejanskih koncentracijah so na voljo v GD 39 (2).

Preskusna kemikalija: porazdelitev velikosti delcev

28. Porazdelitev velikosti delcev aerosolov je treba določiti najmanj vsak teden za vsako koncentracijo s kaskadnim impaktorjem ali nadomestnim instrumentom, kot je aerodinamični merilnik delcev (APS). Če je mogoče prikazati enakovrednost rezultatov, dobljenih s kaskadnim impaktorjem in nadomestnim instrumentom, se lahko nadomestni instrument uporablja skozi celotno študijo.

29. Vzporedno s primarnim instrumentom je treba za potrditev njegove učinkovitosti zbiranja uporabljati še drugo napravo, kot je gravimetrični filter ali (plinska) izpiralka. Masna koncentracija, dobljena z analizo velikosti delcev, mora biti v razumnih mejah masne koncentracije, dobljene z analizo s filtriranjem (glej GD 39 (2)). Če je enakovrednost pri vseh preskušenih koncentracijah mogoče prikazati zgodaj v študiji, se lahko nadaljnje potrditvene meritve opustijo. Zaradi dobrobiti živali je treba sprejeti ukrepe, s katerimi se kar najbolj zmanjša količina pomanjkljivih podatkov, zaradi katerih bi bilo treba študijo ponoviti.

30. Velikost delcev za hlape je treba določiti, če obstaja možnost, da se bodo hlapi kondenzirali v aerosol, ali če se v atmosferi s hlapi, v kateri so mogoče mešane faze, zaznajo delci.

OPAZOVANJA

31. Živali je treba klinično opazovati pred obdobjem izpostavljenosti ter med njim in po njem. Pogostejša opazovanja so lahko indicirana glede na odziv živali med izpostavljenostjo. Kadar opazovanje živali ovirajo uporaba zadrževalnih cevi za živali, slabo osvetljene komore za izpostavljanje celega telesa ali motne atmosfere, je treba živali pozorno opazovati po izpostavljenosti. Z opazovanji živali, preden so te izpostavljene naslednjega dne, je mogoče oceniti reverzibilnost ali okrepitev strupenih učinkov.

▼M4

32. Vsa opažanja se sistematično zabeležijo, pri čemer se evidence vodijo za vsako žival posebej. Kadar se živali usmrtijo iz humanih razlogov ali so najdene poginule, je treba čas smrti navesti čim natančneje.

33. Opazovanja v kletkah morajo vključevati spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznicah, v dihalih, obtočilih in živčevju ter pri somatomotoričnih aktivnostih in vedenjskih vzorcih. Pozorno je treba opazovati tremorje, krče, slinjenje, drisko, letargijo, spanje in komo. Z merjenjem rektalne temperature se lahko pridobijo podporni dokazi o refleksni bradipneji ali hipo-/hipertermiji, povezani s tretiranjem ali konfinacijo. V protokol študije se lahko vključijo dodatne ocene, kot so kinetika, biomonitoring, pljučna funkcija, retencija slabo topnih snovi, ki se kopičijo v pljučnem tkivu, in vedenjske spremembe.

TELESNA TEŽA

34. Težo posameznih živali je treba zabeležiti malo pred prvo izpostavljenostjo (dan 0), zatem pa dvakrat na teden (na primer ob petkih in ponedeljkih, da se prikaže okrevanje čez konec tedna, ko se živali ne izpostavljajo, ali na podlagi časovnega intervala, da se omogoči ocena sistemske strupenosti) ter ob poginu ali evtanaziji. Če v prvih 2 tednih ni učinkov, se lahko do konca študije telesna teža meri tedensko. Živali v satelitski skupini (skupini za reverzibilnost), če se uporabljajo, je treba tedensko tehtati prek celotnega obdobja okrevanja. Ob koncu študije je treba malo pred žrtvovanjem vse živali stehtati, da se omogoči nepristranski izračun razmerij med težo organov in telesno težo.

PORABA HRANE IN VODE

35. Porabo hrane je treba meriti tedensko. Meri se lahko tudi poraba vode.

KLINIČNA PATOLOGIJA

36. Klinične patološke ocene je treba opraviti za vse živali, vključno s tistimi v kontrolni skupini in satelitski skupini (skupini za reverzibilnost), ko se žrtvujejo. Navesti je treba časovni interval med koncem izpostavljenosti in odvzemom krvi, zlasti kadar se obravnavana končna točka hitro vrne v prvotno stanje. Vzorčenje po koncu izpostavljenosti je indicirano za tiste parametre, ki imajo kratko plazemsko razpolovno dobo (npr. COHb, CHE in MetHb).

37. V preglednici 1 so našteti klinični patološki parametri, ki se navadno zahtevajo za vse toksikološke študije. Analiza urina se ne zahteva vedno, vendar se lahko opravi, kadar se zdi koristna na podlagi pričakovane ali opažene strupenosti. Vodja študije se lahko za boljšo opredelitev strupenosti preskusne kemikalije odloči oceniti dodatne parametre (npr. holinesterazo, lipide, hormone, kislinsko-bazno ravnovesje, methemoglobin ali Heinzeva telesca, kreatin-kinazo, razmerje med mieloidnimi in eritroidnimi celicami, troponine, pline v arterijski krvi, laktat-dehidrogenazo, sorbitol-dehidrogenazo ter γ-glutamiltranspeptidazo).

▼M4

Preglednica 1

Standardni klinični patološki parametri

Hematologija	
število eritrocitov	skupno število levkocitov
hematokrit	diferencialno število levkocitov
koncentracija hemoglobina	število trombocitov
povprečna količina hemoglobina v eritrocitih	zmožnost koagulacije (izberite eno):
povprečni volumen eritrocitov	— protrombinski čas
povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih	— čas koagulacije
retikulociti	— parcialni tromboplastinski čas
åKlinična kemija	
glukoza (*)	alanin-aminotransferaza
skupni holesterol	aspartat-aminotransferaza
trigliceridi	alkalna fosfataza
sečninski dušik v krvi	kalij
skupni bilirubin	natrij
kreatinin	kalcij
skupne beljakovine	fosfor
albumin	klorid
globulin	
Analiza urina (ni obvezno)	
videz (barva in motnost)	skupne beljakovine
količina	glukoza
specifična teža ali osmolalnost	kri/krvne celice
pH	

(*) Ker lahko dolgotrajno obdobje postenja vpliva na meritve glukoze pri tretiranih živalih glede na kontrolne živali, mora vodja študije odločiti, ali je živali primerno postiti. Če se uporabi obdobje postenja, mora to ustrezati uporabljeni živalski vrsti; za podgane lahko traja 16 h (postenje čez noč). Določanje glukoze na tešče se lahko izvede po postenju čez noč v zadnjem tednu izpostavljenosti ali po postenju čez noč pred obdukcijo (v zadnjem primeru skupaj z vsemi drugimi kliničnimi patološkimi parametri).

38. Kadar obstajajo dokazi, da je spodnji predel dihalnih poti (tj. alveole) primarno mesto odlaganja in retencije, je lahko bronhoalveolarna lavaža (BAL) najprimernejša tehnika za kvantitativno analizo na hipotezi temelječih parametrov razmerij med odmerkom in učinkom s poudarkom na alveolitisu, vnetju pljuč in fosfolipidozi. Tako je mogoče ustrezno preiskati spremembe v odzivu na odmerek in časovnem poteku alveolarne okvare. Bronhoalveolarni izpirek se lahko uporabi za analizo skupnega in diferencialnega števila levkocitov, skupnih beljakovin ter laktat-dehidrogenaze. Drugi parametri, ki se lahko obravnavajo, so tisti, ki nakazujejo lizosomske poškodbe, fosfolipidozo, fibrozo in dražilno ali alergijsko vnetje – pri slednjem se lahko vključi določitev vnetnih citokinov/kemokinov. Meritve BAL navadno dopolnjujejo rezultate histopatoloških preiskav, ne morejo pa jih nadomestiti. Napotki o tem, kako opraviti lavažo pljuč, so na voljo v GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPSKA PATOLOGIJA IN TEŽA ORGANOV

39. Vse preskusne živali, vključno s tistimi, ki med preskusom poginejo ali so odstranjene iz študije zaradi njihove dobrobiti, je treba popolnoma eksangvinirati (če je to izvedljivo) in na njih opraviti makroskopsko obdukcijo. Navesti je treba čas med koncem zadnje izpostavljenosti vsake živali in njenim žrtvovanjem. Če obdukcije ni mogoče opraviti nemudoma po odkritju poginule živali, jo je treba ohladiti (ne zamrzniti) na dovolj nizko temperaturo, da se avtoliza kar najbolj zmanjša. Obdukcije je treba opraviti takoj, ko je mogoče, navadno v dnevu ali dveh. Za vsako žival je treba zabeležiti vse makroskopske patološke spremembe s posebnim poudarkom na spremembah dihal.

40. V preglednici 2 so našteti organi in tkiva, ki jih je treba med makroskopsko obdukcijo shraniti v ustreznem mediju za histopatološke preiskave. O shranjevanju organov in tkiv [v oglatih oklepajih] ter vseh drugih organov in tkiv odloča vodja študije. Z organov **v krepki pisavi** je treba odstraniti priraščena tkiva in navedene organe stehtati čim prej po disekciji, da se ne izsušijo. Ščitnico in nadmodek je treba stehtati samo, če je to potrebno, ker lahko ostanki obrezovanja otežijo histopatološko oceno. Tkiva in organe je treba takoj po obdukciji in najmanj 24–48 ur (odvisno od uporabljenega fiksativa) pred obrezovanjem fiksirati v 10-odstotnem puferiranem formalinu ali drugem ustreznem fiksativu.

Preglednica 2

Organi in tkiva, ki se shranijo med makroskopsko obdukcijo

nadledvične žleze	semenski mešički
kostni mozeg (in/ali svež punktat)	
možgani (vključno z rezinami velikih in malih možganov ter podaljšane hrbtenjače/mosta)	hrbtenjača (vratni, prsni in ledveni del)
[oči (mrežnica, vidni živec) in veke]	**vranica**
srce	želodec
ledvice	
grlo (3 ravni, 1 raven naj vključuje spodnji del poklopca)	**moda**
jetra	**priželjc**
pljuča (vsi režnji na eni ravni, vključno z glavnima sapnicama)	ščitnica
Hilusne bezgavke, zlasti za slabo topne preskusne kemikalije, ki jih tvorijo delci. Za bolj poglobljene preiskave in/ali študije z imunološkim poudarkom se lahko razmisli o dodatnih bezgavkah, npr. iz medpljučnega, vratnega/podčeljustnega in/ali ušesnega predela.	sapnik (vsaj 2 ravni, ki vključujeta 1 vzdolžni prerez skozi karino in 1 prečni prerez)
nazofaringealna tkiva (vsaj 4 ravni, 1 raven naj vključuje nazofaringealni vod in z nosom povezano limfatično tkivo (NALT))	[sečni mehur]
požiralnik	maternica
[vohalni betič]	
Jajčniki	vse vidne lezije

▼M4

41. Pljuča je treba odstraniti nepoškodovana, jih stehtati in napolniti z ustreznim fiksativom pri tlaku 20–30 cm vode, da se ohrani njihova struktura (5). Rezine je treba zbrati za vse režnje na eni ravni, vključno z glavnima sapnicama, če pa se opravi lavaža pljuč, je treba iz neizpranega režnja vzeti rezine na treh ravneh (ki niso zaporedne).

42. Pregledati je treba najmanj 4 ravni nazofaringealnih tkiv, od katerih mora ena vključevati nazofaringealni vod (5, 6, 7, 8, 9), da se omogoči ustrezna preiskava ploščatega, prehodnega (neciliarnega respiratornega), respiratornega (ciliarnega respiratornega) in vohalnega epitelija, ter drenažno limfatično tkivo (NALT; 10, 11). Preiskati je treba tri ravni grla, od katerih mora ena vključevati spodnji del poklopca (12). Pregledati je treba vsaj dve ravni sapnika, kar vključuje en vzdolžni prerez skozi karino razcepišča glavnih sapnic in en prečni prerez.

HISTOPATOLOGIJA

43. Histopatološko oceno vseh organov in tkiv iz preglednice 2 je treba opraviti pri kontrolni skupini in skupini, tretirani z visoko koncentracijo, ter pri vseh živalih, ki poginejo ali so žrtvovane med študijo. Posebno pozornost je treba nameniti dihalom, ciljnim organom in vidnim lezijam. Organe in tkiva, ki imajo lezije v skupini, tretirani z visoko koncentracijo, je treba pregledati v vseh skupinah. Vodja študije se lahko odloči izvesti histopatološke ocene za dodatne skupine, da se prikaže jasen odziv na koncentracijo. Če se uporablja satelitska skupina (skupina za reverzibilnost), je treba opraviti histopatološko oceno za vsa tkiva in organe, na katerih so bili opaženi učinki v tretiranih skupinah. Če se v skupini, izpostavljeni visoki koncentraciji, pojavijo čezmerno število zgodnjih smrti ali druge težave, ki ogrožajo pomen podatkov, je treba skupino, tretirano z najbližjo nižjo koncentracijo, histopatološko pregledati. Makroskopska opažanja in mikroskopske ugotovitve je treba poskusiti povezati.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

44. Za posamezne živali je treba navesti podatke o telesni teži, porabi hrane, klinični patologiji, makroskopski patologiji, teži organov in histopatologiji. Podatke o kliničnih opažanjih je treba povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navedejo število uporabljenih živali, število živali, ki kažejo specifične znake zastrupitve, število živali, ki so bile najdene poginule med preskusom ali usmrčene iz humanih razlogov, čas smrti posameznih živali, opis in časovni potek strupenih učinkov in reverzibilnosti ter ugotovitve obdukcije. Vse rezultate, kvantitativne in naključne, je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabi se lahko katera koli splošno priznana statistična metoda, izbrati pa jo je treba med zasnovo študije.

Poročilo o preskusu

45. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije, kot je primerno:

Preskusne živali in oskrba

— opis pogojev v kletkah, vključno s številom (ali spremembo števila) živali na kletko, nastiljem, temperaturo in relativno vlažnostjo prostora, fotoperiodo ter opredelitvijo hrane,

▼M4

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev uporabe vrste, ki ni podgana. Podatki o izvoru in preteklosti se lahko navedejo, če se nanašajo na živali, za katere so bili uporabljeni podobni pogoji izpostavljenosti, nastanitveni pogoji in pogoji postenja,

— število, starost in spol živali,

— metodo randomizacije,

— opis morebitne priprave živali pred preskusom, vključno s hrano, karanteno in zdravljenjem.

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (vključno z izomerizacijo),

— identifikacijske podatke in registrsko številko Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), če je znana.

Nosilec

— utemeljitev uporabe nosilca in utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda),

— pretekle ali vzporedno pridobljene podatke, ki dokazujejo, da nosilec ne vpliva na rezultat študije.

Inhalacijska komora

— podroben opis inhalacijske komore, vključno s prostornino in diagramom,

— izvor in opis opreme, uporabljene za izpostavljanje živali in ustvarjanje atmosfere,

— opremo za merjenje temperature, vlažnosti, velikosti delcev in dejanske koncentracije,

— vir zraka in uporabljeni sistem za klimatiziranje,

— metode, uporabljene za umerjanje opreme za zagotavljanje homogene preskusne atmosfere,

— razliko v tlaku (pozitivno ali negativno),

— izpostavitvene odprtine na komoro (izpostavljanje nosu); položaj živali v komori (izpostavljanje celega telesa),

— stabilnost preskusne atmosfere,

— položaj tipal za zaznavanje temperature in vlažnosti ter mesto vzorčenja preskusne atmosfere v komori,

— obdelavo dovajanega/odvajanega zraka,

— stopnje pretoka zraka, stopnjo pretoka zraka/izpostavitveno odprtino (izpostavljanje nosu) ali število živali/komoro (izpostavljanje celega telesa),

— čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja v inhalacijski komori (t_{95}),

— število zamenjav volumna zraka na uro,

— merilne naprave (če se uporabljajo).

Podatki o izpostavljenosti

— utemeljitev izbire ciljne koncentracije v glavni študiji,

▼M4

— nazivne koncentracije (skupna masa ustvarjene preskusne kemikalije v inhalacijski komori, deljena z volumnom zraka, ki preide skozi komoro),

— dejanske koncentracije preskusne kemikalije, ki se vzamejo v območju dihanja živali; za zmesi, pri katerih nastajajo heterogene fizikalne oblike (plini, hlapi, aerosoli), se lahko vsaka analizira ločeno,

— vse koncentracije v zraku je treba navesti v masnih enotah (mg/l, mg/m^3 itd.) in ne v prostorninskih enotah (ppm, ppb itd.),

— porazdelitev velikosti delcev, mediano porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) in geometrični standardni odklon (σg), vključno z metodami za njihov izračun. Poročati je treba o posameznih analizah velikosti delcev.

Preskusni pogoji

— podatke o pripravi preskusne kemikalije, vključno s podrobnostmi o postopkih, uporabljenih za zmanjšanje velikosti delcev trdnih snovi ali pripravo raztopin preskusne kemikalije,

— opis (ki po možnosti vključuje diagram) opreme, uporabljene za ustvarjanje preskusne atmosfere in izpostavljanje živali preskusni atmosferi,

— podatke o opremi, uporabljeni za spremljanje temperature, vlažnosti in pretoka zraka v komori (tj. pripravo umeritvene krivulje),

— podatke o opremi, uporabljeni za jemanje vzorcev za določanje koncentracije in porazdelitve velikosti delcev v komori,

— podatke o uporabljeni kemijski analitski metodi in njeni validaciji (vključno z rekuperacijo preskusne kemikalije iz nosilca za vzorčenje),

— metodo randomizacije pri dodeljevanju živali preskusnim in kontrolnim skupinam,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom hrane in virom vode),

— utemeljitev določitve preskusnih koncentracij.

Rezultati

— preglednice o temperaturi, vlažnosti in pretoku zraka v komori,

— preglednice s podatki o nazivnih in dejanskih koncentracijah v komori,

— preglednice s podatki o velikosti delcev, vključno s podatki o analitskem vzorčenju, porazdelitvijo velikosti delcev ter izračuni MMAD in σ_g,

— preglednice s podatki o odzivu in koncentracijah za vsako žival (tj. za živali, ki kažejo znake zastrupitve, vključno s smrtnostjo ter naravo, resnostjo, časom nastopa in trajanjem učinkov),

▼M4

— preglednice s težami posameznih živali,

— preglednice o porabi hrane,

— preglednice s kliničnimi patološkimi podatki,

— ugotovitve obdukcije in histopatološke ugotovitve za vsako žival, če so na voljo,

— preglednice z drugimi izmerjenimi parametri.

Razprava in razlaga rezultatov

— poseben poudarek je treba nameniti opisu metod, uporabljenih za izpolnitev meril te preskusne metode, npr. glede mejne koncentracije ali velikosti delcev,

— z vidika splošnih ugotovitev je treba obravnavati možnost vdihavanja delcev, zlasti če meril glede velikosti delcev ni bilo mogoče izpolniti,

— v splošno oceno študije je treba vključiti doslednost metod, uporabljenih za določanje nazivne in dejanske koncentracije, ter razmerje med njima,

— obravnavati je treba verjetni vzrok smrti in prevladujoči način delovanja (sistemski ali lokalni),

— če je bilo treba na podlagi meril iz Dokumenta s smernicami OECD o humanih končnih točkah (3) humano žrtvovati živali, ki so trpele bolečine ali kazale znake hudega in trajnega trpljenja, je treba to pojasniti,

— opredeliti je treba ciljne organe,

— določiti je treba vrednosti NOAEL in LOAEL.

VIRI:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Pariz.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

(4) Whalan, J. E. in Redden, J. C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth, D. L., Tyler, W. S., Plopper, C. E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (poglavje 9). V: Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H. P. in Brain, J. D. (ur.), Springer Verlag Heidelberg, str. 229–258.

(6) Young, J. T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

(7) Harkema, J. R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

(8) Woutersen, R. A., Garderen-Hoetmer, A., van Slootweg, P. J., Feron, V. J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. V: Waalkes, M. P. in Ward, J. M. (ur.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

(9) Mery, S., Gross, E. A., Joyner, D. R., Godo, M., Morgan, K. T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

(10) Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M. H., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Breda Vriesman van, P. J. C., Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

(11) Kuper, C. F., Arts, J. H. E., Feron, V. J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

(12) Lewis, D. J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

(13) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼B

B.9 **STRUPENOST (V STIKU S KOŽO) PRI PONAVLJAJOČEM SE ODMERKU (28 DNI)**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod dela B (A).

1.2 OPREDELITVE

Glej Splošni uvod dela B (B).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se 28 dni dnevno nanaša na kožo v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, in sicer en odmerek na skupino. V obdobju dajanja odmerkov se živali vsakodnevno pozorno opazujejo zaradi odkrivanja znakov strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa tudi na preživelih živalih.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Priprave**

Najmanj pet dni pred začetkom preskusa se živali nastanijo v preskusnih pogojih nastanitve in hranjenja. Pred preskusom se zdrave mlade živali naključno izberejo in dodelijo tretiranim in kontrolnim skupinam. Tik pred začetkom preskusa se preskusnim živalim ostriže dlaka s hrbtnega dela trupa. Dlaka se lahko tudi obrije, vendar je treba to opraviti 24 ur pred preskusom. Striženje ali britje je običajno treba ponavljati približno v tedenskih intervalih. Med striženjem ali britjem je treba paziti, da se koža ne odrgne. Za nanos preskusne snovi je treba pripraviti najmanj 10 % telesne površine. Pri določanju površine pripravljenega dela in velikosti nanosa je treba upoštevati maso živali. Pri preskušanju trdnih snovi, ki se po potrebi lahko uprašijo, je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Tekoče preskusne snovi se običajno uporabljajo nerazredčene. Nanosi se opravljajo dnevno, pet do sedem dni na teden.

1.6.2 **Preskusni pogoji**

1.6.2.1 *Poskusne živali*

Uporabijo se lahko odrasle podgane, kunci ali morski prašički. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, vendar je treba njihovo uporabo utemeljiti.

▼B

Ob začetku študije območje nihanja mase uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti.

1.6.2.2 *Število in spol*

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 10 živali (pet samic in pet samcev) z zdravo kožo. Samice morajo biti nulipare in nebreje. Če se načrtujejo žrtvovanja med študijo, je treba število povečati za število živali, predvidenih za žrtvovanje pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitska skupina 10 živali (pet živali na spol) 28 dni tretira z velikim odmerkom in se naslednjih 14 dni opazuje za ugotavljanje reverzibilnosti, obstojnosti ali zapoznelega pojava strupenih učinkov. Uporabi se tudi satelitska skupina 10 kontrolnih živali (pet živali na spol).

1.6.2.3 *Velikost odmerkov*

Potrebne so najmanj tri velikosti odmerkov z eno kontrolo ali, če se uporabi nosilec, s kontrolo nosilca. Obdobje izpostavljenosti mora trajati najmanj šest ur dnevno. Preskusno snov je treba nanašati vsak dan ob istem času, nanose pa je treba v rednih časovnih presledkih (enkrat ali dvakrat tedensko) prilagoditi tako, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali. Razen tretiranja s preskusno snovjo, je treba z živalmi kontrolne skupine ravnati na enak način kakor z živalmi preskusne skupine. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec, se živalim skupine za kontrolo nosilca odmerki dajejo na enak način kakor živalim tretirane skupine in prejeti morajo enako količino, kakor živali skupine, tretirane z največjim odmerkom. Največji odmerek naj povzroči strupene učinke, vendar nič ali malo smrtnih primerov. Najmanjši odmerek ne sme povzročiti nobenih znakov strupenosti. Če obstaja uporabna ocena izpostavljenosti človeka, jo mora najmanjši odmerek presegati. V idealnih razmerah bi vmesna velikost odmerka morala povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če se uporabi več kot en vmesni odmerek, morajo biti intervali med velikostmi odmerkov taki, da povzročijo stopnjevanje strupenih učinkov. V skupinah, tretiranih z majhnimi in vmesnimi odmerki, ter v kontrolni skupini mora biti pogostnost smrtnih primerov majhna, da se omogoči smiselno ovrednotenje rezultatov.

Če nanos preskusne snovi povzroči hudo draženje kože, je treba koncentracije zmanjšati, zaradi česar se lahko zmanjšajo ali ne pokažejo drugi strupeni učinki pri velikih odmerkih. Če se poleg tega koža hudo poškoduje, je morda treba prekiniti študijo in začeti novo študijo z manjšimi koncentracijami.

1.6.2.4 *Mejni preskus*

Če pri predhodni študiji z odmerkom 1 000 mg/kg, ali z večjim odmerkom, ki ustreza možni izpostavljenosti človeka, kadar je ta znana, ni opaznih strupenih učinkov, nadaljnje preskušanje morda ne bo potrebno.

1.6.2.5 *Obdobje opazovanja*

Poskusne živali je treba dnevno opazovati, ali kažejo znake strupenosti. Zapisati je treba čas smrti in čas pojava ter izginotja znakov strupenosti.

▼B

1.6.3 **Postopek**

Vsaka žival mora biti v svoji kletki. Živali se 28 dni, v idealnih razmerah po sedem dni na teden, tretirajo s preskusno snovjo. Živali katere koli satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, je treba pustiti nadaljnjih 14 dni brez tretiranja, da se ugotovi povratnost ali obstojnost strupenih učinkov. Izpostavljanje mora trajati najmanj šest ur dnevno.

Preskusno snov je treba enakomerno nanesti na območje, ki predstavlja približno 10 % skupne telesne površine. Pri zelo strupenih snoveh je površina nanosa lahko manjša, vendar mora biti čim več površine pokrite s čim tanjšo in enakomerno plastjo.

Med izpostavljenostjo mora preskusna snov ostati v stiku s kožo, kar se zagotovi s poroznim gaznim povojem in nedražilnim obližem. Preskusna površina mora biti dodatno ustrezno pokrita, da gazni povoj in preskusna snov ostaneta na istem mestu in se živalim prepreči zaužitje preskusne snovi. Za preprečitev zaužitja se lahko uporabijo pripomočki za omejevanje gibanja, vendar popolna imobilizacija ni priporočena metoda. Lahko se uporabi tudi zaščitni ovratnik.

Ob koncu obdobja izpostavljenosti se ostanek preskusne snovi odstrani, kadar je to izvedljivo, z vodo ali kako drugo ustrezno metodo čiščenja kože.

Vse živali je treba dnevno opazovati in zapisati znake strupenosti, vključno s časom njihovega pojava, stopnjo in trajanjem. Opazovati je treba spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznici ter tudi v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju, somatomotorični aktivnosti in vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba izmeriti maso živali. Priporoča se tudi tedenska meritev porabe hrane. Živali je treba redno opazovati, da se prepreči izguba živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napak pri dajanju v kletke. Ob koncu študije se na vseh preživelih živalih nesatelitskih tretiranih skupin opravi obdukcija. Umirajoče živali in živali v hudem stresu ali s hudimi bolečinami se takoj ob odkritju odstranijo iz kletk ter humano usmrtijo in obducirajo.

Ob koncu preskusa se na vseh živalih, vključno z živalmi kontrolne skupine, opravijo naslednje preiskave:

1. hematološke preiskave, ki vključujejo najmanj določitev hematokrita, koncentracije hemoglobina, števila eritrocitov, skupnega in diferencialnega števila levkocitov in zmožnosti koagulacije;

2. klinične biokemijske preiskave krvi, ki vključujejo določanje najmanj enega parametra delovanja jeter in ledvic: serumska alanin-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-piruvat-transaminaza), serumska aspartat-aminotransferaza (prej poznana kot glutamat-oksaloacetat-transaminaza), sečninski dušik, albumin, kreatinin v krvi, skupni bilirubin in skupne serumske beljakovine.

Druge določitve, ki so lahko potrebne za izdelavo ustrezne ocene strupenosti, vključujejo kalcij, fosfor, klorid, natrij, kalij, postno glukozo, lipide, hormone, ravnovesje kislina/baza, methemoglobin in aktivnost holinesteraze.

▼B

Kadar je potrebno, se za razširitev raziskave opaženih učinkov lahko uporabijo dodatne klinične biokemijske preiskave.

1.6.4 **Makroskopska obdukcija**

Na vseh živalih iz študije je treba izvesti popolno makroskopsko obdukcijo. Najmanj jetra, ledvica, nadledvične žleze in moda je treba stehtati mokre čim prej po disekciji, da se prepreči njihova dehidracija. Organe in tkiva, tj. normalno in tretirano kožo, jetra, ledvica, vranico, moda, nadledvične žleze, srce in tarčne organe (to je tiste organe, ki kažejo makroskopske poškodbe ali spremembe v velikosti), je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitno histopatološko preiskavo v prihodnosti.

1.6.5 **Histopatološka preiskava**

Pri skupini, tretirani z velikim odmerkom, in kontrolni skupini je treba opraviti histološko preiskavo na shranjenih organih in tkivih. Pri vseh skupinah, tretiranih z manjšimi odmerki, je treba preiskati organe in tkiva, ki v skupini z največjim odmerkom kažejo poškodbe, ki se lahko pripišejo preskusni snovi. Živali satelitske skupine je treba histološko preiskati s posebnim poudarkom na tistih organih in tkivih, pri katerih so bili pri drugih tretiranih skupinah ugotovljeni strupeni učinki.

2. **PODATKI**

Podatke je treba povzeti v tabeli, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa in število živali, ki kažejo posamezno vrsto poškodbe.

Vse opažene rezultate je treba ovrednotiti z ustrezno statistično metodo. Uporabi se lahko katera koli priznana statistična metoda.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— podatki o živalih (vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, prehrana itd.),

— preskusni pogoji (vključno z vrsto povoja: okluzivni ali neokluzivni),

— velikost odmerkov (vključno z nosilcem, če je bil uporabljen) in koncentracije,

— velikost odmerka brez učinkov, kadar je možno,

— podatki o strupenem odzivu po spolu in odmerku,

— čas smrti med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka,

— strupeni ali drugi učinki,

— čas odkritja a vsakega nenormalnega znaka in njegov nadaljnji razvoj,

— podatki o hrani in telesni masi,

— opravljeni hematološki preskusi in rezultati,

▼B

— opravljeni klinični biokemijski preskusi in rezultati,

— izsledki obdukcije,

— podroben opis vseh histopatoloških izsledkov,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je možno,

— razprava o rezultatih,

— razlaga rezultatov.

3.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod dela B (D).

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B (E).

▼M7

B.10 *IN VITRO* PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ PRI SESALCIH

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 473 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnate informacije o preskušanju v zvezi z genetsko tokskikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

Namen *in vitro* preskusa kromosomskih aberacij je opredeliti kemikalije, ki povzročajo strukturne kromosomske aberacije v kultiviranih celicah sesalcev (2) (3) (4). Ločimo dva tipa strukturnih aberacij, in sicer: kromosomski in kromatidni tip. Pri preskusih *in vitro* bi se lahko pojavila poliploidija (vključno z endoreduplikacijo). Čeprav lahko anevgene snovi povzročijo poliploidijo, ta sama ne pomeni anevgenega potenciala in lahko samo nakazuje motnjo celičnega cikla ali citotoksičnost (5). Ta preskus ni zasnovan za merjenje anevploidije. Za odkrivanje anevploidije je priporočljiv preskus mikronukleusov *in vitro* (6).

Pri *in vitro* preskusu kromosomskih aberacij se lahko uporabijo kulture trajnih celičnih linij ali primarne celične kulture človeškega ali glodalskega izvora. Uporabljene celice je treba izbrati glede na zmožnost rasti v kulturi, stabilnost kariotipa (vključno s kromosomskim številom) in pogostnost spontanih kromosomskih aberacij (7). Na podlagi razpoložljivih podatkov za zdaj ni mogoče navesti trdnih priporočil, vendar je iz njih razvidno, da je treba pri ocenjevanju kemične nevarnosti upoštevati status beljakovine *p53*, gensko stabilnost (stabilnost kariotipa), sposobnost popravljanja DNK in izvor (glodalski/človeški) celic, izbranih za preskušanje. Uporabnikom te preskusne metode se torej priporoča, naj upoštevajo vpliv te in drugih lastnosti celic na vpliv celične linije pri odkrivanju indukcije kromosomskih aberacij, saj se znanje na tem področju razvija.

Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije, razen če so celice v zvezi s preskusno kemikalijo sposobne presnavljanja. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi lahko vodili do lažno pozitivnih rezultatov, tj. kromosomskih poškodb, ki jih ne bi povzročilo neposredno medsebojno delovanje preskusnih kemikalij in kromosomov; med take pogoje so vključene spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (8) (9) (10), medsebojno delovanje sestavin gojišča (11) (12) ali previsoke ravni citotoksičnosti (13) (14) (15) (16).

Ta preskus se uporablja za odkrivanje kromosomskih aberacij, ki so lahko posledica klastogenih dogodkov. Analizo indukcije kromosomskih aberacij je treba izvesti z uporabo celic v metafazi. Zato je bistveno, da v celicah tretiranih in netretiranih kultur poteka mitoza. Pri proizvedenih nanomaterialih so morda potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

▼M7

NAČELO PRESKUSA

Človeške celične kulture ali celične kulture drugih sesalcev so preskusni kemikaliji izpostavljene z zunanjim virom presnovne aktivacije ali brez njega, razen če se uporabijo celice, ki imajo ustrezno sposobnost presnavljanja (glej odstavek 13). Po tem ko so celične kulture izpostavljene preskusni kemikaliji, se v ustreznih, vnaprej določenih intervalih tretirajo s kemikalijo, ki zavira metafazo (npr. kolcemidom ali kolhicinom), nato se odvzamejo in obarvajo, celice v metafazi pa se mikroskopsko analizirajo, da se ugotovi prisotnost aberacij kromatidnega in kromosomskega tipa.

OPIS METODE

Priprave

Celice

Uporabijo se lahko različne celične linije (npr. celice jajčnikov kitajskega hrčka (CHO), pljuča kitajskega hrčka V79, pljuča kitajskega hrčka (CHL)/IU, TK6) ali primarne celične kulture, vključno z limfociti periferne krvi človeka ali drugih sesalcev (7). Izbiro celičnih linij je treba znanstveno utemeljiti. Pri uporabi primarnih celic je treba zaradi dobrobiti živali razmisliti o uporabi človeških primarnih celic, če je to izvedljivo, ter jih vzorčiti v skladu s človeškimi etičnimi načeli in predpisi. Limfocite periferne krvi človeka je treba pridobiti od mladih oseb (starih med približno 18 in 35 let), ki ne kadijo, nimajo znanih bolezni ali niso bili nedavno izpostavljeni takim stopnjam genotoksičnih snovi (npr. kemikalijam, ionizirajočemu sevanju), zaradi katerih bi se povečala pojavnost kromosomskih aberacij v ozadju. Tako se zagotovi, da je pojavnost kromosomskih aberacij v ozadju nizka in konsistentna. Osnovna pojavnost kromosomskih aberacij se povečuje s starostjo in ta trend je izrazitejši pri ženskah kot pri moških (17) (18). Če se za uporabo zberejo celice več kot enega darovalca, je treba navesti število darovalcev. Prikazati je treba, da so se celice delile od začetka tretiranja s preskusno kemikalijo do njihovega vzorčenja. Celične kulture se vzdržujejo v eksponentni fazi rasti celic (celične linije) ali se stimulira njihova delitev (primarne kulture limfocitov), da se izpostavijo celice v različnih fazah celičnega cikla, saj morda ni znano, kako so posamezne faze celičnega cikla občutljive na preskusne kemikalije. Primarne celice, katerih delitev je treba stimulirati z mitogeni, med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji v splošnem niso več sinhronizirane (npr. človeški limfociti po 48-urni stimulaciji z mitogeni). Uporaba sinhronih celic med tretiranjem ni priporočljiva, vendar je lahko na podlagi utemeljitve sprejemljiva.

Gojišča in pogoji kultiviranja

Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO_2, če je ustrezno, temperatura inkubacije 37 °C). Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo (7) (19); celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celičnih linij ali primarnih kultur, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic (20).

Priprava kultur

Celične linije: celice se namnožijo iz osnovnih kultur, nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju še naprej eksponentno rastejo do odvzema celic (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

▼M7

Limfociti: celotna kri, obdelana z antikoagulantom (npr. heparinom), ali ločeni limfociti se dodajo v gojišče (človeški limfociti npr. za 48 ur), ki vsebuje mitogen [za človeške limfocite npr. fitohemaglutinin], da se spodbudi delitev celic pred izpostavitvijo preskusni kemikaliji.

Presnovna aktivacija

Pri uporabi celic, ki nimajo ustrezne notranje sposobnosti presnavljanja, je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljani sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodalcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (21) (22) (23), ali z mešanico fenobarbitala in β–naftoflavona (24) (25) (26) (27) (28) (29). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (30) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za induciranje oksidaz z mešano funkcijo (24) (25) (26) (28). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Med tretiranjem se je treba izogibati kemičnim izdelkom, ki zmanjšujejo mitotični indeks, zlasti snovem, ki tvorijo kalcijev kompleks (31). Na izbiro vrste in koncentracije zunanjega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred kemikalij, ki se preskušajo.

Priprava preskusne kemikalije

Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in, če je ustrezno, razredčiti (glej odstavek 23). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (32) (33) (34). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preskusni pogoji

Topila

Izbrati je treba tako topilo, ki optimizira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rast celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila v končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba vključiti netretirane kontrole (glej Dodatek 1), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali klastogenih učinkov.

Merjenje celične proliferacije in citotoksičnosti ter izbira koncentracij za tretiranje

Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 22), obarjanje v gojiščih (glej odstavek 23) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 5). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo

▼M7

vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufra v končno obdelovalno gojišče, da se izogne lažno pozitivnim rezultatom in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

Z meritvami celične proliferacije se zagotovi, da med preskusom poteka mitoza v zadostnem številu tretiranih celic in da se tretiranja izvedejo pri ustreznih ravneh citotoksičnosti (glej odstavka 18 in 22). Citotoksičnost je treba v glavnem preskusu določiti s presnovno aktivacijo ali brez nje, pri čemer je treba uporabiti ustrezni kazalnik celične smrti in rasti. Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Če se izvede, ne sme nadomestiti merjenja citotoksičnosti v glavnem preskusu.

Za oceno citotoksičnosti v citogenetskih preskusih sta ustrezni metodi relativna podvojitev populacije ali relativno povečanje števila celic (13) (15) (35) (36) (55) (glej Dodatek 2 za formule). V primeru dolgotrajnega tretiranja in časov vzorčenja po začetku tretiranja, ki so daljši od 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla (tj. daljši od skupaj 3 celičnih ciklov), se lahko pri relativni podvojitvi populacije vrednost citotoksičnosti podceni (37). V tem primeru je boljše merilo relativno povečanje števila celic ali je v pomoč ocena citotoksičnosti po 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla, pri čemer se uporabi relativna podvojitev populacije.

Glede limfocitov v primarnih kulturah je mitotični indeks, čeprav je merilo citotoksičnih/citostatskih učinkov, odvisen od časa meritve po tretiranju, uporabljenega mitogena in morebitne motnje celičnega cikla. Vendar je mitotični indeks sprejemljiv, ker so druge meritve citotoksičnosti lahko težavne in nepraktične ter jih morda ni mogoče uporabiti za ciljno populacijo limfocitov, ki rastejo zaradi stimulacije s fitohemaglutininom.

Čeprav sta relativno povečanje števila celic in relativna podvojitev populacije priporočena parametra citotoksičnosti za celične linije, mitotični indeks pa za primarno kulturo limfocitov, lahko drugi kazalniki (npr. celična neokrnjenost, nekroza, apoptoza, celični cikel) zagotovijo koristne dodatne podatke.

Oceniti je treba vsaj tri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Ne glede na vrsto celic (celične linije ali primarne kulture limfocitov) se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji tretira ponovitev kulture ali le ena sama kultura. Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, je sprejemljiva tudi ena sama kultura, če je skupno število celic v eni kulturi ali ponovitvah kulture enako. Uporaba ene kulture je zlasti pomembna, če se ocenjujejo več kot 3 koncentracije (glej odstavek 31). Za analizo podatkov se lahko zberejo rezultati, pridobljeni pri neodvisnih ponovitvah kulture za zadevno koncentracijo (38). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, bodo ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje iz navedene nastale citotoksičnosti, kot je opisano v odstavku 22, ter vključevati

▼M7

koncentracije, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za pridobitev podatkov za nizko in zmerno citotoksičnost ali podrobno proučevanje razmerja med odzivom in odmerkom uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in/ali več kot tri koncentracije (ena kultura ali ponovitve kultur), zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 47).

Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati, da citotoksičnost ne preseže razpona 55 ± 5 %, pri čemer se uporabljajo priporočeni parametri citotoksičnosti (tj. zmanjšanje relativnega povečanja števila celic in relativne podvojitve populacije za celične linije ter zmanjšanje mitotičnega indeksa za primarne kulture limfocitov na razpon 45 ± 5 % sočasne negativne kontrole). Pozitivne rezultate, ki se nahajajo le na višjem koncu tega razpona citotoksičnosti, ki znaša 55 ± 5 %, je treba razlagati previdno (13).

Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa (npr. barvanje ali štetje). Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.

Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora biti najvišja preskusna koncentracija 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (39) (40) (41). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so npr. snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB) (42), okoljski ekstrakt itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (43).

Kontrole

V vsak odvzem celic je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 15), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.

Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokaže zmožnost laboratorija, da odkrije klastogene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, in učinkovitost zunanjega sistema presnovne aktivacije, če je ustrezno. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge kemikalije, če je to utemeljeno. Ker *in vitro* preskusi genotoksičnosti za celice sesalcev niso dovolj standardizirani, je lahko uporaba pozitivnih kontrol omejena na klastogen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. Če se izvaja sočasno z neaktiviranim preskusom, pri katerem se uporablja enak čas tretiranja, se pri tem enem odzivu pozitivne kontrole pokaže tako delovanje sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (brez S9) uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema (kar pomeni, da so učinki jasni, vendar pri odčitavanju ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov), odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi presegla meje, določene za to preskusno metodo.

▼M7

Preglednica 1

Referenčne kemikalije, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Kemikalija	Št. CAS
1. Klastogeni, aktivni brez presnovne aktivacije		
	metil metansulfonat	66-27-3
	mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokvinolin-N-oksid	56-57-5
	citozin arabinozid	147-94-4
2. Klastogeni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija		
	benzo(a)piren	50-32-8
	ciklofosfamid	50-18-0

POSTOPEK

Tretiranje s preskusno kemikalijo

Množeče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije.

Čas odvzema celic iz kulture

Za temeljito oceno, ki bi bila potrebna za sklep o negativnem rezultatu, je treba izvesti vse tri naslednje preskusne pogoje ter pri tem uporabiti kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje ter dolgotrajno tretiranje brez presnovne aktivacije (glej odstavke 43, 44 in 45):

— celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji brez presnovne aktivacije in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (18);

— celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji s presnovno aktivacijo in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (18);

— celice morajo biti nenehno izpostavljene brez presnovne aktivacije, dokler se ne vzorčijo ob času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla. Določene kemikalije (npr. nukleozidni analogi) se lažje odkrijejo, če so časi tretiranja/vzorčenja daljši od 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla (24).

Če so pri katerem koli od navedenih preskusnih pogojev rezultati pozitivni, morda ni treba raziskovati nobenih drugih režimov tretiranja.

Priprava kromosomov

Celične kulture se obdelajo s kolcemidom ali kolhicinom, in sicer običajno eno do tri ure pred odvzemom celic. Celice se odvzamejo in obdelajo za pripravo kromosomov iz vsake kulture posebej. Priprava kromosomov vključuje hipotonično obdelavo celic, fiksiranje in barvanje. V monosloju so lahko po zaključku

▼M7

obdelave, ki traja od 3 do 6 ur, prisotne mitotične celice (so okrogle in se ločujejo od površine). Ker se te mitotične celice zlahka ločijo, se lahko ob odstranitvi gojišča s preskusno kemikalijo izgubijo. Če obstaja dokaz o znatnem povečanju števila mitotičnih celic v primerjavi s kontrolnimi vzorci, ki kažejo verjetno mitotično zaviranje, je treba celice zbrati s centrifugiranjem in jih dodati nazaj h kulturam, da ne bi izgubili celic, v katerih poteka mitoza in pri katerih ob odvzemu obstaja tveganje kromosomske aberacije.

Analiza

Vse preparate, vključno s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba pred mikroskopsko analizo kromosomskih aberacij neodvisno označiti. Ker fiksiranje pogosto povzroči pretrganje dela celic v metafazi, ki imajo izgubljene kromosome, mora biti število centromer v štetih celicah pri vseh vrstah celic enako modalnemu številu ± 2.

Na vsako koncentracijo in vsako kontrolo je treba v štetje vključiti vsaj 300 dobro vidnih metafaz, da se lahko sklepa, da je preskusna kemikalija jasno negativna (glej odstavek 45). Če se uporabljajo ponovitve kulture, mora biti teh 300 celic enakomerno porazdeljenih med ponovitvami. V primeru uporabe ene kulture na koncentracijo (glej odstavek 21) je treba v tej kulturi v štetje vključiti vsaj 300 dobro vidnih metafaz. Prednost štetja 300 celic je v tem, da poveča statistično moč preskusa in da se redko opazijo ničelne vrednosti (po pričakovanjih le 5 %) (44). Število štetih metafaz se lahko zmanjša, če se opazi veliko število celic s kromosomskimi aberacijami in se sklepa, da je preskusna kemikalija jasno pozitivna.

Šteti je treba celice s strukturnimi kromosomskimi aberacijami, vključno z vrzelmi in brez njih. Prelomi in vrzeli so opredeljeni v Dodatku 1 v skladu s (45) (46). Kromatidne in kromosomske aberacije je treba zabeležiti posebej in jih razvrstiti v podvrste (prelomi, izmenjave). S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so zelo usposobljene za štetje, in da se po potrebi izvede medsebojni strokovni pregled.

Čeprav je preskus namenjen odkrivanju strukturnih kromosomskih aberacij, je pomembno, da se poliploidija in endoreduplikacija zabeležita, ko se opazita. (Glej odstavek 2.)

Usposobljenost laboratorija

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi kemikalijami, ki delujejo z različnimi mehanizmi in različnimi negativnimi kontrolami (z uporabo različnih topil/vehiklov), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavku 37.

Izbor kemikalij za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1 v odstavku 26) je treba preiskati s kratkotrajnim ali dolgotrajnim tretiranjem brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje klastogenih snovi in določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemijskih snovi, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokaže občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

▼M7

Podatki o kontroli iz preteklih preskusov

Laboratorij mora določiti:

— območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter

— območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (44) (47). Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (48)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (44). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (47).

Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba proučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav celic s kromosomskimi aberacijami iz ene kulture ali vsote ponovitev kulture, kot je opisano v odstavku 21. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (44) (47). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 37), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

Oceniti je treba odstotek celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Ločeno je treba navesti kromatidne in kromosomske aberacije, razvrščene glede na podvrste (prelomi, izmenjave), skupaj z njihovim številom in pogostostmi za poskusne in kontrolne kulture. Vrzeli se zabeležijo in o njih se poroča ločeno, vendar se ne vključijo v skupno število pogostnosti aberacij. Ko se opazi poliploidija in/ali endoreduplicirane celice, se poroča o njihovem odstotku.

Zabeležiti je treba sočasne meritve citotoksičnosti za vse tretirane, negativne in pozitivne kontrolne kulture v glavnih poskusih, ki se nanašajo na aberacije.

Navedejo se podatki za posamezne kulture. Poleg tega se vsi podatki povzamejo v obliki preglednice.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa temelji na naslednjih merilih:

— Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 39.

▼M7

— Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 26) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.

— Izpolnjena morajo biti merila za celično proliferacijo v kontroli s topilom (odstavka 17 in 18).

— Preskušeni so bili vsi trije preskusni pogoji, razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (glej odstavek 28).

— Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavka 31 in 21).

— Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 22, 23 in 24.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 28):

a) pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b) je povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c) je kateri koli od rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi, glej odstavek 39).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek kromosomskih aberacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (49) (50) (51).

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 28):

a) pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b) ne pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c) vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 39).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti nastanka kromosomskih aberacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Štetje dodatnih celic (po potrebi) ali izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9)).

Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključi, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen.

▼M7

Povečanje števila poliploidnih celic kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov in povzročanje numeričnih kromosomskih aberacij (52). Povečanje števila celic z endoredupliciranimi kromosomi lahko pomeni, da lahko preskusne kemikalije zavirajo potek celičnega cikla (53) (54) (glej odstavek 2). Pojav poliploidnih celic in celic z endoredupliciranimi kromosomi je zato treba zabeležiti ločeno.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/nosilcu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila;

— navesti je treba tudi odstotek topila v končnem gojišču.

Celice:

— vrsta in izvor celic;

— lastnosti kariotipa in ustreznost uporabljene vrste celic;

— za celične linije – odsotnost mikoplazme;

— za celične linije – informacije o trajanju celičnega cikla, podvojitvenem času ali indeksu proliferacije;

— spol donorjev krvi, starost in vse pomembne informacije o donorju, uporabljeni krvi v celoti ali ločenih limfocitih, mitogenih;

— za celične linije – število pasaž, če je na voljo;

— za celične linije – metode vzdrževanja celičnih kultur;

— za celične linije – modalno število kromosomov.

▼M7

Preskusni pogoji:

— identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija in čas izpostavljenosti celic;

— koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v μg ali mg/ml ali mM gojišča);

— razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;

— sestava gojišča, koncentracija CO_2, če je na voljo, stopnja vlažnosti;

— koncentracija (in/ali volumen) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;

— temperatura inkubacije;

— čas inkubacije;

— trajanje tretiranja;

— odvzem celic po tretiranju;

— gostota celic ob nasaditvi, če je ustrezno;

— vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali volumen zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9);

— kemikalije pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;

— metode priprave preparatov in uporabljene tehnike barvanja;

— merila za sprejemljivost poskusov;

— merila za štetje aberacij;

— število analiziranih metafaz;

— metode merjenja citotoksičnosti;

— vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;

— uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

Rezultati:

— število tretiranih celic in število odvzetih celic za vsako kulturo, kadar se uporabljajo celične linije;

— meritve citotoksičnosti, npr. relativna podvojitev populacije, relativno povečanje števila celic in mitotični indeks, morebitna druga opažanja;

— informacije o trajanju celičnega cikla, času podvojitve ali indeksu proliferacije v primeru celičnih linij;

— znaki obarjanja in čas odkritja;

▼M7

— opredelitev aberacij, vključno z vrzelmi;

— število štetih celic, število celic s kromosomskimi aberacijami in vrsta kromosomskih aberacij, ki se navedejo ločeno za vsako tretirano in kontrolno kulturo, vključno z vrzelmi in brez njih;

— spremembe v ploidnosti (poliploidne celice in celice z endoreduplicirani kromosomi, navedene ločeno), če so opažene;

— razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

— podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);

— podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, skupaj z razponi, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni ter 95-odstotnimi kontrolnimi mejami za porazdelitev, pa tudi število podatkov;

— statistične analize, p-vrednosti, če obstajajo.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Evans, H. J. (1976). „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, zv. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York in London, str. 1–29.

(3) Ishidate, M. Jr. in Sofuni, T. (1985). „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture“ in *Progress in Mutation Research*, zv. 5, Ashby, J. idr. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam – New York – Oxford, str. 427–432.

(4) Galloway, S. M. idr. (1987). Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 10/dod. 10, str. 1–175.

(5) Muehlbauer, P. A. idr. (2008). „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 49/4, str. 318–327.

(6) Poglavje B.49 te priloge: *Preskus mikronukleusov in vitro pri celicah sesalcev.*

(7) ILSI paper (osnutek), Lorge, E., Moore, M., Clements, J., O Donovan, M., Darroudi, F., Honma, M., Czich, A., van Benthem, J., Galloway, S., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J. in Kirkland, D. J. Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. idr. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, zv. 257/2, str. 147–204.

(9) Morita, T. idr. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 268/2, str. 297–305.

(10) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 8/6, str. 789–886.

▼**M7**

(11) Long, L. H. idr. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* zv. 634/1–2, str. 177–183.

(12) Nesslany, F. idr. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 49/6, str. 439–452.

(13) Galloway, S. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 35/3, str. 191–201.

(14) Kirkland, D. idr. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 584/1–2, str. 1–256.

(15) Greenwood, S. idr. (2004). Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 43/1, str. 36–44.

(16) Hilliard, C. A. idr. (1998). Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 31/4, str. 316–326.

(17) Hedner, K. idr. (1982). Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, zv. 62, str. 305–309.

(18) Ramsey, M. J. idr. (1995). The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, zv. 338, str. 95–106.

(19) Coecke, S. idr. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, zv. 33/3, str. 261–287.

(20) Henderson, L. idr. (1997). Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, zv. 12/3, str. 163–167.

(21) Ames, B. N., McCann, J. in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, zv. 31/6, str. 347–363.

(22) Maron, D. M. in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, zv. 113/3–4, str. 173–215.

(23) Natarajan, A. T. idr. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, zv. 37/1, str. 83–90.

(24) Matsuoka, A., Hayashi, M. in Ishidate Jr., M. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, zv. 66/3, str. 277–290.

(25) Ong, T.-m. idr. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* zv. 4/1, str. 55–65.

(26) Elliot, B. M. idr. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, zv. 7/3, str. 175–177.

▼M7

(27) Matsushima, T. idr. (1976). „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“ in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J. idr. (eds.), Elsevier, North-Holland, str 85–88.

(28) Galloway, S. M. idr. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, zv. 312/3, str. 241–261.

(29) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. in Galloway, S. M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* zv. 28/1, str. 51–59.

(30) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP). Na voljo na: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J. D. in Christensen, M. L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, zv. 190/3, str. 225–8.

(32) Krahn, D. F., Barsky F. C. in McCooey, K. T. (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R. R., Costa, D. L. in Schaich, K. M. (eds.), Plenum, New York, str. 91–103.

(33) Zamora, P. O. idr. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 5/6, str. 795–801.

(34) Asakura, M. idr. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, zv. 652/2, str. 122–130.

(35) Lorge, E. idr. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 655/1–2, str. 1–3.

(36) Galloway, S. idr. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 723/2, str. 77–83.

(37) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, zv. 724/1–2, str. 86–87.

(38) Richardson, C. idr. (1989). *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.

(39) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Smernice za preskušanje 473, 476 in 487) ENV/JM/TG(2014)17. Na voljo na zahtevo.

(40) Morita, T., Honma, M. in Morikawa, K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, št. 741/1–2, str. 32–56.

(41) Brookmire, L., Chen, J. J. in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* zv. 54/1, str. 36–43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Na voljo na: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 198, OECD Publishing, Pariz.

(45) ISCN (2013). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L. G., MacGowan-Gordon, J. in Schmid, M. (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. idr. (1990). „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*“, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 62–86.

(47) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, zv. 723/2, str. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement,* druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., Levin, B. in Paik, M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3. izdaja., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S. M. idr. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 10/dod. 10, str. 1–175.

(51) Richardson, C. idr. (1989). „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.

(52) Warr, T. J., E. M. Parry in J. M. Parry (1993). A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, zv. 287/1, str. 29–46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, zv. 119/3, str. 403–413.

(54) Huang, Y., Change, C. in Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, zv. 43/3, str. 1362–1364.

(55) Soper, K. A. in S. M. Galloway (1994). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, zv. 312, str. 139–149.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Anevplodija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Apoptoza: programirana celična smrt, za katero je značilna vrsta korakov, ki vodijo v razgradnjo celic na delce, obdane z membrano, ki se nato odstranijo s fagocitozo ali osipanjem.

Celična proliferacija: povečanje števila celic kot posledica mitotične delitve celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Kromatidni prelom: prekinitev ene kromatide, pri čemer je jasno vidna neporavnanost ene od kromatid.

Kromatidna vrzel: neobarvano območje (akromatska lezija) posamezne kromatide, pri čemer je neporavnanost kromatide minimalna.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posamezne kromatide ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali evkariotskih organizmih.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v to preskusno metodo, pri katerih se uporabljajo celične linije, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne podvojitve populacije (RPD) ali relativnega povečanja števila celic (RICC) pri tretiranih celicah v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej odstavek 17 in Dodatek 2). Za poskuse, zajete v to preskusno metodo, pri katerih se uporabljajo primarne kulture limfocitov, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje mitotičnega indeksa pri tretiranih celicah v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej odstavek 18 in Dodatek 2).

Endoreduplikacija: proces, pri katerem v jedru po podvajanju DNK v fazi S ne začne potekati mitoza, temveč takoj nastopi druga faza S. Rezultat tega je, da nastanejo kromosomi s 4, 8, 16, … kromatidami.

Genotoksičen: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami genov, kromosomskimi aberacijami in anevploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajno poškodbo kromosomov.

Mitotični indeks (MI): razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje proliferacije te populacije.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukturi kromosomov (kromosomske aberacije).

▼M7

Numerična aberacija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od običajnega števila, ki je značilno za uporabljene celice.

Poliploidija: numerične kromosomske aberacije v celicah ali organizmih, ki ne vplivajo na posamezen kromosom ali kromosome (anevploidija), temveč na celoten set kromosomov.

Status beljakovine p53: beljakovina p53 je vključena v reguliranje celičnega cikla, apoptozo in popravljanje DNK. Celice brez funkcionalne beljakovine p53, ki ne morejo zaustaviti celičnega cikla ali odstraniti poškodovanih celic z apoptozo ali drugimi mehanizmi (npr. indukcijo popravljanja DNK), povezanimi s funkcijami beljakovine p53, s katerimi se ta odzove na poškodbo DNK, so teoretično bolj nagnjene h genskim mutacijam ali kromosomskim aberacijam.

Relativno povečanje števila celic (RICC): povečanje števila celic v kulturah, izpostavljenih kemikalijam, v primerjavi s povečanjem v netretiranih kulturah, pri čemer je razmerje izraženo kot odstotek.

Relativna podvojitev populacije (RPD): povečanje števila podvojitev populacije v kulturah, izpostavljenih kemikalijam, v primerjavi s povečanjem v netretiranih kulturah, pri čemer je razmerje izraženo kot odstotek.

Frakcija S9, pripravljena iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki je vidna pri mikroskopskem pregledu metafazne stopnje celične delitve, v obliki delecij in fragmentov, transpozicij ali interkromosomskih translokacij.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirane kontrole: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

▼M7

Dodatek 2

FORMULE ZA OCENJEVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Mitotični indeks (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{število mitotičnih celic}}{\text{skupno število štetih celic}} \times 100$$

Priporočljiva sta **relativno povečanje števila celic (RICC)** ali **relativna podvojitev populacije (RPD)**, saj se pri obeh metodah upošteva delež celične populacije, ki se je delil.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{povečanje števila celic v tretiranih kulturah}(\text{končno} - \text{začetno}))}{(\text{povečanje števila celic v kontrolnih kulturah}(\text{končno} - \text{začetno}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{št.podvojitev populacije v tretiranih kulturah})}{(\text{št.podvojitev populacije v kontrolnih kulturah})} \times 100$$

pri čemer je:

podvojitev populacije = [log (število celic po tretiranju ÷ prvotno število celic)] ÷ log 2

Na primer RICC ali RPD s 53 % pomeni 47-odstotno citotoksičnost/citostazo, 55-odstotna citotoksičnost/citostaza, izmerjena z MI, pa pomeni, da dejanski MI znaša 45 % vrednosti kontrole.

V vsakem primeru je treba izmeriti število celic pred tretiranjem ter število celic v tretiranih kulturah in negativnih kontrolnih kulturah.

Čeprav se je v preteklosti kot parameter citotoksičnosti uporabljalo relativno število celic (RCC) (tj. število celic v tretiranih kulturah/število celic v kontrolnih kulturah), to ni več priporočljivo, saj lahko podceni vrednost citotoksičnosti.

V negativnih kontrolnih kulturah mora biti podvojitev populacije združljiva z zahtevo po vzorčenju celic po tretiranju v času, ki ustreza približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla, mitotični indeks pa mora biti dovolj visok, da v zadostnem številu celic poteka mitoza in se zanesljivo izračuna 50-odstotno zmanjšanje.

▼M7

B.11 PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V KOSTNEM MOZGU SESALCEV

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 475 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnate informacije o preskušanju v zvezi z genetsko tokskikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

Preskus kromosomskih aberacij *in vivo* v kostnem mozgu sesalcev je posebej primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivom, čeprav se lahko od vrste do vrste razlikujejo. Preskus *in vivo* je uporaben tudi za nadaljnjo preiskavo genotoksičnosti, odkrite s sistemom *in vitro*.

Preskus kromosomskih aberacij *in vivo* pri sesalcih se uporablja za odkrivanje strukturnih kromosomskih aberacij, ki jih povzroči preskusna kemikalija v celicah kostnega mozga živali, običajno glodalcev (2) (3) (4) (5). Ločimo dva tipa strukturnih kromosomskih aberacij, in sicer: kromosomski in kromatidni tip. Večina genotoksičnih, kemijsko induciranih aberacij je kromatidnih, lahko pa se pojavijo tudi aberacije kromosomskega tipa. Kromosomske poškodbe in podobni pojavi so vzrok številnih genskih bolezni pri človeku in obstajajo tehtni dokazi, da so te lezije in podobni pojavi, ki povzročajo spremembe v onkogenih in genih zaviralcih rasti tumorjev, povezani z rakom pri človeku in v poskusnih sistemih. Pri *in vivo* preskusih kromosomske aberacije lahko pride do poliploidije (vključno z endoreduplikacijo). Poliplodija sama po sebi še ne pomeni anevgenega potenciala, pač pa lahko samo nakazuje motnjo celičnega cikla ali citotoksičnost. Ta preskus ni zasnovan za merjenje anevploidije. Preskus mikronukleusov v eritrocitih sesalcev *in vivo* (poglavje B.12 te priloge) ali preskus mikronukleusov *in vitro* pri celicah sesalcev (poglavje B.49 te priloge) sta preskus *in vivo* oziroma *in vitro*, ki se priporočata za odkrivanje anevploidije.

Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

V tem preskusu se običajno uporabljajo glodalci, vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, če je to znanstveno upravičeno. Ciljno tkivo pri tem preskusu je kostni mozeg, saj je zelo vaskularizirano in vsebuje populacijo celic s hitrim potekom cikla, ki se z lahkoto izolirajo in obdelajo. V poročilu je treba znanstveno utemeljiti uporabo drugih vrst glodalcev, ki niso podgane in miši. Če se ne uporabljajo glodalci, temveč druge vrste, je priporočljivo, da se merjenje kromosomskih aberacij v kostnem mozgu vključi v drug ustrezen preskus toksičnosti.

Če obstajajo dokazi, da preskusne kemikalije ali njihovi metaboliti ne bodo dosegli ciljnega tkiva, ta preskus morda ni primeren.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

▼M7

NAČELO PRESKUSNE METODE

Živali se preskusni kemikaliji izpostavijo z ustreznim načinom izpostavljenosti in se humano evtanazirajo ob primernem času po tretiranju. Pred evtanazijo se živali tretirajo z zaviralcem metafaze (npr. kolhicinom ali kolcemidom). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz celic kostnega mozga ter se analizirajo kromosomske aberacije v celicah v metafazi.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Preverjanje usposobljenosti

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora dokazati, da je sposoben ponoviti pričakovane rezultate iz objavljenih podatkov (npr. (6)) za pogostost kromosomskih aberacij z vsaj dvema kemikalijama za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi, ki jih povzročijo majhni odmerki v pozitivnih kontrolah), kot so tiste iz preglednice 1, in z združljivimi kontrolami z vehiklom/topilom (glej odstavek 22); s tem laboratorij tudi dokaže, da ima zadostne izkušnje z izvajanjem poskusov. Pri teh poskusih je treba uporabiti odmerke, pri katerih se omogočajo ponovljiva in z odmerkom povezana povečanja ter se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema v zadevnem tkivu (kostni mozeg) in uporabi metoda štetja, ki jo je treba uporabljati v laboratoriju. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljeno v odstavkih 10 do 14.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Med preverjanjem usposobljenosti mora laboratorij določiti:

— območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter

— območje in porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov.

Ko se podatki o porazdelitvi negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če ti obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol iz preteklih preskusov dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora biti statistično zanesljiva, s čimer se zagotovi, da je laboratorij sposoben oceniti porazdelitev svojih podatkov o negativnih kontrolah. Iz virov je razvidno, da je potrebnih vsaj 10 preskusov, po možnosti pa mora biti zbirka sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (7)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“. Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (8).

Kadar laboratorij med preverjanjem usposobljenosti (opisanim v odstavku 9) ne izvede zadostnega števila preskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve negativnih kontrol (glej odstavek 11), je sprejemljivo, da se lahko porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi. Pri tem pristopu je treba upoštevati priporočila, navedena v virih (8), rezultati negativnih kontrol, pridobljeni pri teh poskusih, pa morajo ostati skladni z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah.

▼M7

Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba proučiti glede na vpliv, ki ga ima na to, da pridobljeni podatki ostanejo skladni z obstoječo zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov je treba ustvariti le v primeru večjih neskladnosti, kadar se s strokovno presojo oceni, da se razlikuje od prejšnje porazdelitve (glej odstavek 11). Ko se zbirka podatkov ustvarja na novo, za izvedbo dejanskega preskusa ni potrebna celotna zbirka podatkov o negativnih kontrolah, če lahko laboratorij dokaže, da vrednosti njegovih sočasnih negativnih kontrol ostajajo skladne s prejšnjo zbirko podatkov ali z ustreznimi objavljenimi podatki.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav strukturnih kromosomskih aberacij (razen vrzeli) za vsako žival. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrole iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 11), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

OPIS METODE

Priprave

Izbira živalske vrste

Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve mladih zdravih odraslih živali. Običajno se uporabljajo podgane, primerne pa so lahko tudi miši. Uporabi se lahko katera koli druga ustrezna vrsta sesalcev, če je to v poročilu znanstveno utemeljeno.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

Pri glodalcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodalce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol in tretirano skupino, če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

Običajno se uporabljajo zdrave mlade živali (kar pri glodalcih pomeni, da so ob začetku tretiranja stare po možnosti od 6 do 10 tednov, čeprav so sprejemljive tudi nekoliko starejše živali), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

Priprava odmerkov

Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem

▼M7

razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola, in sicer odvisno od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Topilo/vehikel

Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme zbujati suma, da lahko kemično reagira s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje ali koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča strukturnih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

Kontrole

Pozitivne kontrole

V vsak preskus je treba običajno vključiti skupino živali, tretiranih s kemikalijo za pozitivno kontrolo. To se lahko odpravi, ko preskusni laboratorij dokaže svojo usposobljenost za izvajanje preskusov in določi območje pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov. Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirani in nebarvani mikroskopski preparati). Ti se lahko pridobijo tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev) v laboratoriju, kjer se preskus izvaja; na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.

Kemikalije za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno povečanje pogostosti celic s spontanimi strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Odmerke za pozitivno kontrolo je treba izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve beleži, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se odmerki v pozitivno kontrolo dajejo na način, ki ni enak kot pri preskusni kemikaliji, in da se pri tem uporabi drugačen časovni razpored tretiranja ter se vzorčenje opravi le enkrat. Poleg tega se lahko, če je ustrezno, za pozitivno kontrolo uporabijo kemikalije, ki spadajo v isto skupino nevarnosti kot preskusna kemikalija. Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1

Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo

Kemikalija	Št. CAS
etil metansulfonat	62-50-0
metil metansulfonat	66-27-3
etilnitrozourea	759-73-9
mitomicin C	50-07-7
ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
trietilenmelamin	51-18-3

▼M7

Negativne kontrole

V vsak čas vzorčenja je treba vključiti negativno kontrolno skupino živali, ki jo je treba sicer obravnavati enako kot tretirane skupine, vendar se je ne sme tretirati s preskusno kemikalijo. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja topilo/vehikel, ga mora prejeti tudi kontrolna skupina. Toda če sta iz podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov pri vsakem času vzorčenja za preskusni laboratorij razvidni konsistentna variabilnost med posameznimi živalmi in pogostost celic s strukturnimi aberacijami, potem za negativno kontrolo zadostuje le eno samo vzorčenje. Če se za negativne kontrole uporablja eno samo vzorčenje, mora biti to prvi čas vzorčenja, uporabljen v študiji.

POSTOPEK

Število in spol živali

Na splošno je odziv mikronukleusov pri živalih moškega in ženskega spola podoben (9) in pričakovati je, da bo to veljajo tudi za strukturne kromosomske aberacije; zato se lahko študije izvajajo na živalih enega ali drugega spola. Če se pri podatkih pokažejo pomembne razlike med moškim in ženskim spolom (npr. razlike v sistemski toksičnosti, metabolizmu, biološki razpoložljivosti, toksičnosti za kostni mozeg itd., vključno s študijo za ugotavljanje območja), je treba spodbujati uporabo obeh spolov. V takem primeru je študijo primerno izvajati na živalih obeh spolov, npr. kot del toksikološke študije s ponavljajočim odmerkom. V primeru uporabe obeh spolov je primerno uporabiti zasnovo preskusa z več dejavniki. Podrobnosti o tem, kako analizirati podatke z uporabo te zasnove, so navedene v Dodatku 2.

Ob začetku študije je treba določiti skupine, v katerih je vsaj 5 živali enega spola ali vsakega od spolov, če se uporabljata oba, ki jih je mogoče analizirati, na skupino. Kadar bi bila lahko izpostavljenost ljudi kemikalijam omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih izdelkih, je treba preskus opraviti na živalih ustreznega spola. Praviloma je za študijo kostnega mozga pri dveh časih vzorčenja s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolo (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali enega spola) običajno potrebnih 45 živali.

Velikost odmerkov

Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (10). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer s povzročitvijo upočasnitve pridobivanja telesne teže ali citotoksičnosti za hematopoetski sistem, ne pa smrti ali znakov bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (11)).

Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nastanek nekaterih znakov toksičnosti za kostni mozeg.

Kemikalije, ki kažejo nasičenost toksikokinetičnih lastnosti ali povzročajo procese razstrupljanja, zaradi katerih se lahko po dolgotrajnem tretiranju zmanjša izpostavljenost, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.

Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za ugotavljanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti,

▼M7

mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (kostni mozeg) opazi pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo.

Mejni preskus

Če poskusi za ugotavljanje območja odmerka ali obstoječi podatki iz povezanih živalskih sevov kažejo, da režim tretiranja z vsaj mejnim odmerkom (opisan v nadaljevanju) ne povzroči vidnih toksičnih učinkov (tudi brez upočasnitve proliferacije kostnega mozga ali drugih dokazov o citotoksičnosti za ciljno tkivo), ter če genotoksičnost na podlagi *in vitro* študij genotoksičnosti ali podatkov o strukturno sorodnih kemikalijah ni pričakovana, ni potrebna popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov, če se dokaže, da preskusne kemikalije dosežejo ciljno tkivo (kostni mozeg). V takih primerih morda zadostuje že ena velikost odmerka pri mejnem odmerku. Pri obdobju dajanja, ki presega 14 dni, je mejni odmerek 1 000 mg/kg telesne teže na dan. Pri obdobju odmerjanja, ki je enako 14 dnem ali manj, je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, topično podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem, intratrahealno ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo v splošnem ni priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (glej odstavka 33 in 34). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri višjih koncentracijah običajno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim nižji ravni, da se zagotovi konstanten volumen glede na telesno težo pri vseh odmerkih.

Časovni razpored tretiranja

Preskusne kemikalije se običajno dajo v enem odmerku, lahko pa tudi v razdeljenem odmerku (kar pomeni dva ali več odmerkov v istem dnevu na največ 2 do 3 ure), s čimer se olajša dajanje velike količine kemikalije. V teh okoliščinah ali v primeru dajanja preskusne kemikalije z vdihavanjem je treba čas vzorčenja načrtovati glede na čas zadnjega odmerka ali konca izpostavljenosti.

Za ta preskus je na voljo malo podatkov o ustreznosti protokola s ponavljajočimi se odmerki. Vendar je treba v okoliščinah, v katerih je ta preskus zaželeno vključiti v preskus s ponavljajočimi se odmerki, paziti, da se izognemo izgubi kromosomsko poškodovanih mitotičnih celic, ki se lahko pojavi pri toksičnih

▼M7

odmerkih. Taka vključitev je sprejemljiva, kadar je najvišji odmerek enak ali večji od mejnega odmerka (glej odstavek 29) in se skupini, ki prejema odmerke, med celotnim obdobjem tretiranja daje mejni odmerek. Preskus mikronukleusov (preskusna metoda B.12) je treba šteti kot priporočeni *in vivo* preskus kromosomskih aberacij, kadar je zaželeno, da se vključi v druge študije.

Vzorce kostnega mozga je treba odvzeti dvakrat ob različnih časih po prejemu posameznih odmerkov. Pri glodalcih je prvi čas vzorčenja enak času, ki potreben za dokončanje 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla (pri čemer je slednji običajno 12 do 18 ur po obdobju tretiranja). Čas, potreben za sprejem in metabolizem preskusnih kemikalij ter njihov učinek na dinamiko celičnega cikla, lahko vpliva na optimalni čas za odkritje kromosomskih aberacij, zato je priporočljivo, da se vzorci ponovno odvzamejo 24 ur po prvem času vzorčenja. Pri prvem času vzorčenja je treba tretirati vse skupine, ki prejemajo odmerke, in vzeti vzorce za analizo; pri poznejših časih vzorčenja pa je treba dati le najvišje odmerke. Če se na podlagi znanstvene utemeljitve uporabljajo režimi odmerjanja, ki trajajo več kot en dan, je treba na splošno uporabljati en čas vzorčenja ob približno 1,5 dolžine normalnega celičnega cikla po zadnjem tretiranju.

Živalim se po tretiranju in pred vzorčenjem intraperitonealno vbrizga ustrezen odmerek zaviralca metafaze (npr. kolcemid ali kolhicin), nato pa se ob ustreznem intervalu odvzamejo vzorci. Pri miših je ta interval približno 3 do 5 ur, pri podganah pa 2 do 5 ur pred vzorčenjem. Celice se odvzamejo iz kostnega mozga, nabreknejo, fiksirajo in obarvajo ter analizirajo, da se odkrijejo kromosomske aberacije (12).

Opazovanja

Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in zabeležiti klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba humano evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (11).

Izpostavljenost ciljnega tkiva

Ob ustreznih časih je treba odvzeti vzorec krvi, da se lahko preišče raven preskusnih kemikalij v plazmi, s čimer se dokaže, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga, če je to utemeljeno in če ne obstajajo drugi podatki o izpostavljenosti (glej odstavek 44).

Preparati kostnega mozga in kromosomov

Takoj po humani evtanaziji se pridobijo celice kostnega mozga iz stegnenic ali golenic živali in se nato izpostavijo hipotonični raztopini in fiksirajo. Celice v metafazi so nato nanesejo na objektna stekelca in obarvajo z uporabo uveljavljenih metod (glej (3) in (12)).

▼M7

Analiza

Vse mikroskopske preparate, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba pred analizo neodvisno označiti in naključno razdeliti, tako da oseba, ki beleži ugotovitve, ne pozna pogojev tretiranja.

Kot merilo citotoksičnosti je treba določiti mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah na žival za vse tretirane živali (vključno s pozitivnimi kontrolami), netretirane živali negativne kontrole ali živali negativne kontrole z nosilcem/vehiklom.

Pri vsaki živali je treba analizirati vsaj 200 metafaz za strukturne kromosomske aberacije, vključno z vrzelmi in brez njih (6). Če je v zbirki podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov v preskusnem laboratoriju srednja vrednost pogostosti strukturnih kromosomskih aberacij v ozadju < 1 %, je treba razmisliti o štetju dodatnih celic. Kromatidne in kromosomske aberacije je treba zabeležiti posebej in razvrstiti v podvrste (prelomi, izmenjave). S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so zelo usposobljene za štetje, in da se po potrebi izvede medsebojni strokovni pregled. Ob priznavanju, da postopki pripravljanja preparatov pogosto povzročijo pretrganje dela metafaz in posledično izgubo kromosomov, število centromer v štetih celicah torej ne sme biti manjše od $2n \pm 2$, pri čemer je n haploidno število kromosomov za zadevno vrsto.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako žival je treba oceniti mitotični indeks, število štetih metafaznih celic, število aberacij na celico v metafazi in odstotek celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Različne vrste strukturnih kromosomskih aberacij je treba navesti skupaj z njihovimi števili in pogostostjo za tretirane in kontrolne skupine. Vrzeli ter poliploidne celice in celice z endoreduplicirani kromosomi je treba zabeležiti ločeno. O pogostosti vrzeli se poroča, vendar se tega običajno ne vključi v analizo celotne pogostosti strukturnih aberacij. Če ni dokaza o razliki v odzivu med spoloma, se lahko pri statistični analizi podatki za oba spola združijo. Sporočiti je treba tudi podatke o toksičnosti za živali in klinične znake.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili:

a) podatki o sočasni negativni kontroli se štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov (glej odstavke 11 do 14);

b) sočasne pozitivne kontrole ali kontrole za štetje morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavka 20 in 21);

c) analizirano je ustrezno število odmerkov in celic;

d) merila za izbor najvišjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 25 do 28.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

▼M7

a) se vsaj pri eni od tretiranih skupin pokaže statistično značilno povečanje pogostosti celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami (razen vrzeli) v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b) je to povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c) je kateri koli od teh rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi).

Če se pri določenem času vzorčenja prouči le najvišji odmerek, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če obstaja statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo in so rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi). Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (13). Pri analizi razmerja med odmerkom in odzivom je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke. V statističnih preskusih se kot poskusna enota uporabi žival. Pozitivni rezultati preskusa kromosomskih aberacij kažejo, da preskusna kemikalija povzroči nastanek strukturnih kromosomskih aberacij v kostnem mozgu preskušane vrste.

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev:

a) pri nobeni tretirani skupini ne pokaže statistično značilno povečanje pogostosti celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami (razen vrzeli) v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b) pri katerem koli času vzorčenja ne pojavi z odmerkom povezano povečanje, če se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c) so vsi rezultati znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi) ter

d) se je pojavila izpostavljenost kostnega mozga preskusnim kemikalijam.

Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (13). Dokazi o izpostavljenosti kostnega mozga preskusni kemikaliji lahko vključujejo zmanjšanje mitotičnega indeksa ali meritve ravni preskusnih kemikalij v plazmi ali krvi. Pri intravenoznem dajanju dokaz o izpostavljenosti ni potreben. Druga možnost za dokaz izpostavljenosti kostnega mozga je uporaba podatkov ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion – absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje), pridobljenih v neodvisni študiji, ki je bila opravljena z enakim načinom izpostavljenosti in istimi vrstami. Negativni rezultati pomenijo, da preskusna kemikalija pri preskusnih pogojih ne povzroča strukturnih kromosomskih aberacij v kostnem mozgu preskušane vrste.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

V primerih, ko odziv ni jasno negativen ali pozitiven, in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje), je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami zaključenih obstoječih poskusov. V nekaterih primerih je koristno, če se analizira več celic ali poskus ponovi s spremenjenimi preskusnimi pogoji.

▼M7

Podatki v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav ne omogočajo sklepa o tem, ali preskusna kemikalija povzroča pozitivne ali negativne rezultate, zato se zaključi, da je odziv dvoumen.

Pogostost poliploidnih in endoredupliciranih metafaz med skupnim številom metafaz je treba zabeležiti posebej. Povečanje števila poliploidnih/endoredupliciranih celic kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov ali poteka celičnega cikla (glej odstavek 3).

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Povzetek

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Priprava preskusne kemikalije:

— utemeljitev izbire vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;

— priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;

— analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če so na voljo.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;

— število, starost in spol živali;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— metoda edinstvene identifikacije živali;

— pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo dlje kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

▼M7

Preskusni pogoji:

— pozitivne in negativne kontrole (z vehiklom/topilom);

— podatki iz študije za ugotavljanje območja, če je bila izvedena;

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— utemeljitev načina in trajanja dajanja kemikalije;

— metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla krvni obtok ali kostni mozeg;

— dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže na dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in poraba hrane/pitne vode, če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— metoda za evtanazijo;

— metoda za analgezijo (če se uporablja);

— podroben opis ter utemeljitev časovnega razporeda tretiranj in vzorčenj izbir;

— metode za pripravo preparatov;

— metode za merjenje toksičnosti;

— identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija, odmerek in čas dajanja pred vzorčenjem;

— postopki za izolacijo in hrambo vzorcev;

— merila za štetje aberacij;

— število analiziranih celic v metafazi na žival in število analiziranih celic za določitev mitotičnega indeksa;

— merila za sprejemljivost študije;

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali nedokončnih.

Rezultati:

— stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;

— mitotični indeks, naveden za vsako žival posebej;

— vrsta in število aberacij ter celic z aberacijami, navedene za vsako žival posebej;

— skupno število aberacij na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

— število celic z aberacijami na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

▼M7

— spremembe v ploidnosti, če so opažene, vključno s pogostostjo poliploidnih in/ali endoreduplicirani celic;

— razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;

— uporabljena statistična analiza in metoda;

— podatki, ki dokazujejo, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga;

— podatki o sočasnih negativnih kontrolah in pozitivnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

— podatki o negativnih in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni in 95-odstotne kontrolne meje za porazdelitev ter obravnavano časovno obdobje in število opazovanj;

— izpolnjena merila za pozitivni ali negativni odziv.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

Viri

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Adler, I. D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach. Venittand, S. in Parry, J. M. (eds.), IRL Press, Washington, DC, str. 275–306.

(3) Preston, R. J. idr. (1987). Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, zv. 189/2, str. 157–165.

(4) Richold, M. idr. (1990). In Vivo Cytogenetics Assays, v Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 115–141.

(5) Tice, R. R. idr. (1994). Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, zv. 312/3, str. 305–312.

(6) Adler, I. D. idr. (1998). Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 417/1, str. 19–30.

(7) Ryan, T. P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement, druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 723/2, str. 87–90.

(9) Hayashi, M. idr. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, zv. 312/3, str. 293–304.

(10) Fielder, R. J. idr. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, zv. 7/5, str. 313–319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št.°19, OECD Publishing, Pariz.

(12) Pacchierotti, F. in Stocchi, V. (2013). Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, št. 1044, str. 147–163.

(13) Lovell, D. P. idr. (1989). Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D. J. (ur.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 184–232.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Anevplodija: je vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za večkratnik celotnega števila kromosomov (prim.: poliploidija).

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posameznih kromatid ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Endoreduplikacija: proces, pri katerem v jedru po podvajanju DNK v fazi S ne začne potekati mitoza, temveč takoj nastopi druga faza S. Rezultat tega so kromosomi s 4, 8, 16 … kromatidami.

Vrzel: akromatska lezija, ki je manjša od širine ene kromatide, z zelo majhno neporavnanostjo kromatid.

Mitotični indeks: razmerje med številom celic v mitozi in skupnim številom celic v populaciji, ki je merilo statusa proliferacije navedene celične populacije.

Numerična aberacija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene živali (anevploidija).

Poliploidija: numerična kromosomska aberacija, ki vključuje spremembo števila celotnega seta kromosomov v primerjavi s spremembo števila v delu seta kromosomov (prim.: anevploidija).

Strukturna kromosomska aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki se lahko odkrije pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve in je vidna v obliki delecij in fragmentov, transpozicij ali interkromosomskih translokacij.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M7

Dodatek 2

ZASNOVA PRESKUSA Z VEČ DEJAVNIKI ZA OPREDELITEV RAZLIK MED SPOLOMA PRI PRESKUSU KROMOSOMSKIH ABERACIJ *IN VIVO*

Zasnova preskusa z več dejavniki in analiza v njenem okviru

Pri tej zasnovi se preskusi vsaj 5 živali moškega in vsaj 5 živali ženskega spola pri vsaki koncentraciji, tako da se uporabi vsaj 40 živali (20 moškega in 20 ženskega spola ter ustrezne pozitivne kontrole).

Ta zasnova, ki je ena enostavnejših zasnov preskusa z več dejavniki, je enakovredna dvosmerni analizi variance, pri čemer sta glavna učinka spol in koncentracija. Podatki se lahko analizirajo z različnimi standardnimi statističnimi programskimi paketi, kot so SPSS, SAS, STATA, Genstat, ter z uporabo programskega jezika R.

Z analizo se variabilnost v naboru podatkov popolnoma razvrsti v variabilnost med spoloma, variabilnost med koncentracijami in variabilnost, povezano z medsebojnim vplivom med spoloma in koncentracijami. Vsak pogoj se preskusi glede na oceno variabilnosti med živalmi iz ponovljenih preskusov v skupinah živali istega spola pri isti koncentraciji. Celotne podrobnosti osnovne metodologije so na voljo v številnih standardnih statističnih učbenikih (glej vire) in pomoči uporabnikom, ki jo zagotavljajo statistični paketi.

Analiza se začne s pregledom pogojev medsebojnega vpliva „spol x koncentracija“ v preglednici z analizo variance ([1]). Če ni precejšnjega medsebojnega vpliva, zagotavljajo skupne vrednosti za spola ali koncentracije veljavne statistične preskuse med koncentracijami, ki temeljijo na združenem vplivu variabilnosti znotraj skupine v preglednici z analizo variance.

Analiza se nadaljuje s popolno razvrstitvijo ocene med variabilnostjo koncentracij v kontraste, s čimer se zagotovi preskus za linearne in kvadratne kontraste odzivov med različnimi koncentracijami. Če „spol x koncentracija“ kaže znaten medsebojni vpliv, se lahko ta vpliv popolnoma razvrsti v medsebojne vplive „linearni kontrast x spol“ in „kvadratni kontrast x spol“. S temi vplivi se zagotavljajo preskusi tega, ali so odzivi na koncentracije za oba spola vzporedni ali pa so odzivi med spoloma različni.

Ocena združene variabilnosti znotraj skupine se lahko uporabi za pare preskusov v zvezi z razlikami med srednjimi vrednostmi. Te primerjave se lahko naredijo med srednjimi vrednostmi za oba spola in med srednjimi vrednostmi za različne koncentracije, kot na primer za primerjave s stopnjami v negativnih kontrolah. V primerih z znatnim medsebojnim vplivom se lahko primerjajo srednje vrednosti različnih koncentracij pri istem spolu ali srednje vrednosti obeh spolov pri isti koncentraciji.

Viri

Obstajajo številni statistični učbeniki, v katerih se razpravlja o teoriji, zasnovi, metodologiji, analizi in razlagi zasnove preskusov z več dejavniki, ki se gibljejo od najenostavnejših analiz z dvema dejavnikoma do bolj zapletenih oblik, uporabljenih v metodologiji zasnove poskusov. Naslednji seznam ni izčrpen. V nekaterih knjigah so obdelani primeri primerljivih zasnov, ki imajo v nekaterih primerih kodo za izvajanje analize z uporabo različnih programskih paketov.

([1]) Statistiki, ki uporabljajo pristop modeliranja, kot so splošni linearni modeli, lahko analizo začnejo na drugačen, a primerljiv način, vendar ne bodo nujno izpeljali običajne preglednice z analizo variance, ki sega v čas algoritemskih pristopov k izračunavanju statističnih podatkov, razvitih v predračunalniški dobi.

▼**M7**

Box, G. E. P, Hunter, W. G. in Hunter, J. S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box, G. E. P. in Draper, N. R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C. P. in Davey, A. J. H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery, D. C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B. J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C. F. J in Hamada, M. S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12 PRESKUS MIKRONUKLEUSOV V ERITROCITIH SESALCEV

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 474 (2016). Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnate informacije o preskušanju v zvezi z genetsko tokskikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

Preskus mikronukleusov *in vivo* pri sesalcih je posebej primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in procesi popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivom, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Preskus *in vivo* je uporaben tudi za nadaljnjo preiskavo genotoksičnosti, odkrite s sistemom *in vitro*.

Preskus mikronukleusov *in vivo* pri sesalcih se uporablja za odkrivanje škode, ki jo preskusna kemikalija povzroči na kromosomih ali mitotičnem aparatu eritroblastov. Pri preskusu se ocenjuje nastajanje mikronukleusov v eritrocitih, vzorčenih v kostnem mozgu ali celicah periferne krvi živali, običajno glodalcev.

Namen preskusa mikronukleusov je opredeliti kemikalije, ki povzročajo citogenetske poškodbe, zaradi katerih nastanejo mikronukleusi, ki vsebujejo zaostale fragmente kromosomov ali cele kromosome.

Kadar se eritroblast kostnega mozga razvije v nezrel eritrocit (ki se včasih imenuje tudi polikromatski eritrocit ali retikulocit), se jedro izvrže; vsak nastali mikronukleus lahko ostane v citoplazmi. V teh celicah je lažje videti ali odkriti mikronukleuse, saj nimajo jedra. Povečanje pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi pri tretiranih živalih je znak nastanka strukturnih ali numeričnih kromosomskih aberacij.

Novo nastali eritrociti z mikronukleusi se opredelijo in količinsko določijo z barvanjem, čemur sledi bodisi vizualno štetje z mikroskopom bodisi z avtomatizirano analizo. Štetje zadostnega števila nezrelih eritrocitov v periferni krvi ali kostnem mozgu odraslih živali se precej olajša z uporabo avtomatizirane platforme za štetje. Take platforme so sprejemljive alternative ročnemu ocenjevanju (2). Iz primerjalnih študij je razvidno, da lahko take metode, pri katerih so uporabljeni ustrezni kalibracijski standardi, zagotovijo boljšo ponovljivost in občutljivost v enem in več laboratorijih kot ročno štetje pod mikroskopom (3) (4). Avtomatizirani sistemi, s katerimi se lahko izmeri pogostost eritrocitov z mikronukleusi, vključujejo, niso pa omejeni na pretočne citometre (5), platforme za analizo slike (6) (7) in laserske vrstične citometre (8).

Čeprav se to običajno ne izvaja kot del preskusa, se lahko fragmenti kromosomov od celih kromosomov razlikujejo po številnih merilih. Mednje je vključena opredelitev prisotnosti ali odsotnosti kinetohora ali centromerne DNK, kar je oboje lastnost nepoškodovanih kromosomov. Če kinetohor ali centromerna DNK nista prisotna, to pomeni, da mikronukleusi vsebujejo samo fragmente kromosomov, če pa eden od njiju je, to označuje izgubo kromosomov.

Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

▼M7

ZAČETNI PREUDARKI

Ciljno tkivo za genetske poškodbe v tem preskusu je kostni mozeg mladih odraslih glodalcev, saj v tem tkivu nastajajo eritrociti. Sprejemljive so tudi meritve mikronukleusov v nezrelih eritrocitih periferne krvi pri drugih sesalcih, za katere je bila dokazana ustrezna občutljivost za odkrivanje kemikalij, ki v teh celicah povzročajo strukturne in numerične kromosomske aberacije (z nastajanjem mikronukleusov v nezrelih eritrocitih), in podana znanstvena utemeljitev. Glavna končna točka je pogostost nezrelih eritrocitov z mikronukleusi. Kot končna točka pri vrstah brez močne vranične selekcije proti celicam z mikronukleusi in v primeru, ko se živali tretirajo nepretrgano v obdobju, ki presega življenjsko dobo eritrocita v uporabljenih vrstah (npr. 4 tedne ali več za miš), se lahko uporabi tudi pogostost zrelih eritrocitov periferne krvi, ki vsebujejo mikronukleuse.

Če obstajajo dokazi, da preskusne kemikalije ali njihovi metaboliti ne bodo dosegli ciljnega tkiva, ta preskus morda ni primeren.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSNE METODE

Živali se primerno izpostavijo preskusni kemikaliji. Če se uporabi kostni mozeg, se živali ob primernem času po tretiranju humano evtanazirajo, nato se ekstrahira kostni mozeg ter naredijo in obarvajo preparati (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Če se uporabi periferna kri, se ta odvzame ob primernem času po tretiranju, nato se pripravijo in obarvajo preparati (12) (16) (17) (18). Pri akutnem dajanju odmerka je pomembno izbrati kostni mozeg ali čas odvzema krvi, pri katerem se lahko odkrije nastanek s tretiranjem povezanih nezrelih eritrocitov z mikronukleusi. V primeru vzorčenja periferne krvi mora preteči dovolj časa, da se ti dogodki pojavijo tudi v krvnem obtoku. Preparati se analizirajo, da se določi prisotnost mikronukleusov, in sicer z vizualizacijo z mikroskopom, analizo slike, pretočnim citometrom ali laserskim vrstičnim citometrom.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Preverjanje usposobljenosti

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora dokazati, da je sposoben ponoviti pričakovane rezultate iz objavljenih podatkov (17) (19) (20) (21) (22) za pogostost mikronukleusov z vsaj dvema kemikalijama pozitivne kontrole (vključno z blagimi odzivi, ki jih povzročijo majhni odmerki v pozitivnih kontrolah), kot so tiste iz preglednice, 1 in z združljivimi kontrolami z vehiklom/topilom (glej odstavek 26); s tem laboratorij tudi dokaže, da ima zadostne izkušnje z izvajanjem preskusa. Pri teh poskusih je treba uporabiti odmerke, pri katerih se omogočajo ponovljiva in z odmerkom povezana povečanja ter se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema v zadevnem tkivu (kostni mozeg ali periferna kri) in uporabi metoda štetja, ki jo je treba uporabljati v laboratoriju. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljeno v odstavkih 14 do 18.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Med preverjanjem usposobljenosti mora laboratorij določiti:

— območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter

▼M7

— območje in porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov.

Ko se podatki o porazdelitvi negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če ti obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol iz preteklih preskusov dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora biti statistično zanesljiva, s čimer se zagotovi, da je laboratorij sposoben oceniti porazdelitev svojih podatkov o negativnih kontrolah. Iz virov je razvidno, da je potrebnih vsaj 10 preskusov, po možnosti pa mora biti zbirka sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (23)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“. Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (tj. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (24).

Kadar laboratorij med preverjanjem usposobljenosti (opisanim v odstavku 13) ne izvede zadostnega števila preskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve negativnih kontrol (glej odstavek 15), je sprejemljivo, da se lahko porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi. Pri tem pristopu je treba upoštevati priporočila, navedena v virih (24), rezultati negativnih kontrol, pridobljeni pri teh poskusih, pa morajo ostati skladni z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah.

Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba proučiti glede na vpliv, ki ga ima na to, da pridobljeni podatki ostanejo skladni z obstoječo zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov je treba ustvariti le v primeru večjih neskladnosti, kadar se s strokovno presojo oceni, da se razlikuje od prejšnje porazdelitve (glej odstavek 15). Ko se zbirka podatkov ustvarja na novo, za izvedbo dejanskega preskusa ni potrebna celotna zbirka podatkov o negativnih kontrolah, če lahko laboratorij dokaže, da vrednosti njegovih sočasnih negativnih kontrol ostajajo skladne s prejšnjo zbirko podatkov ali z ustreznimi objavljenimi podatki.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav nezrelih eritrocitov z mikronukleusi za vsako žival. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrole iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 15), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

OPIS METODE

Priprave

Izbira živalske vrste

Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve mladih zdravih odraslih živali. Uporabijo se lahko miši, podgane ali druge ustrezne vrste sesalcev. Če se uporablja periferna kri, je treba zagotoviti, da odstranjevanje vraničnih celic z mikronukleusi iz krvnega obtoka ne vpliva na odkrivanje nastalih mikronukleusov pri izbranih vrstah. To je bilo jasno prikazano za periferno kri pri

▼M7

miših in podganah (2). V poročilu je treba znanstveno utemeljiti uporabo drugih vrst glodalcev, ki niso podgane in miši. Če se ne uporabljajo glodalci, temveč druge vrste, je priporočljivo, da se merjenje nastalih mikronukleusov vključi v drug ustrezen preskus toksičnosti.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

Pri glodalcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodalce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol in tretirano skupino, če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

Običajno se uporabljajo zdrave mlade živali (kar pri glodalcih pomeni, da so ob začetku tretiranja stare po možnosti od 6 do 10 tednov, čeprav so sprejemljive tudi nekoliko starejše živali), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

Priprava odmerkov

Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola, in sicer odvisno od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Preskusni pogoji

Topilo/vehikel

Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme biti sposoben kemično reagirati s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, olj̨no olje ali koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča nastanka mikronukleusov ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

▼M7

Kontrole

Pozitivne kontrole

V vsak preskus je treba običajno vključiti skupino živali, tretiranih s kemikalijo za pozitivno kontrolo. To se lahko odpravi, ko preskusni laboratorij dokaže svojo usposobljenost za izvajanje preskusov in določi območje pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov. Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirane in nebarvane mikroskopske preparate ali vzorce celične suspenzije, kar je ustrezno za metodo štetja). Ti se lahko pridobijo tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev); na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.

Kemikalije za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno spontano povečanje pogostosti mikronukleusov. Pri ročnem štetju z mikroskopijo je treba odmerke pozitivnih kontrol izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve beleži, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se odmerki v pozitivno kontrolo dajejo na način, ki ni enak kot pri preskusni kemikaliji, in da se pri tem uporabi drugačen časovni razpored tretiranja ter se vzorčenje opravi le enkrat. Poleg tega se lahko, če je ustrezno, za pozitivno kontrolo uporabijo kemikalije, ki spadajo v isto skupino nevarnosti kot preskusna kemikalija. Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1

Primeri kemikalij za pozitivno kontrolo

Kemikalije in št. CAS
etil metansulfonat [št. CAS: 62-50-0]
metil metansulfonat [št. CAS: 66-27-3]
etilnitrozourea [št. CAS: 759-73-9]
mitomicin C [št. CAS: 50-07-7]
ciklofosfamid (monohidrat) [št. CAS: 50-18-0 (št. CAS: 6055-19-2)]
trietilenmelamin [št. CAS: 51-18-3]
kolhicin [št. CAS: 64-86-8] ali vinblastin [št. CAS: 865-21-4] – kot anevgena

Negativne kontrole

V vsak čas vzorčenja je treba vključiti negativno kontrolno skupino živali, ki jo je treba sicer obravnavati enako kot tretirane skupine, vendar se je ne sme tretirati s preskusno kemikalijo. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja topilo/vehikel, ga mora prejeti tudi kontrolna skupina. Toda če sta iz podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov pri vsakem času vzorčenja za preskusni laboratorij razvidni konsistentna variabilnost med posameznimi živalmi in pogostost celic z mikronukleusi, potem za negativno kontrolo zadostuje le eno samo vzorčenje. Če se za negativne kontrole uporablja eno samo vzorčenje, mora biti to prvi čas vzorčenja, uporabljen v študiji.

▼M7

Če se uporablja periferna kri, je namesto sočasne negativne kontrole sprejemljiv vzorec, vzet pred tretiranjem, kadar so podatki, ki iz tega izhajajo, skladni z zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov za preskusni laboratorij. Za podgane se je pokazalo, da ima vzorčenje majhnih količin (npr. pod 100 µl na dan) pred tretiranjem minimalen učinek na pogostost mikronukleusov v ozadju (25).

POSTOPEK

Število in spol živali

Na splošno je odziv mikronukleusov pri živalih moškega in ženskega spola podoben, zato se lahko študije izvajajo na živalih enega ali drugega spola (26). Če se pri podatkih pokažejo pomembne razlike med moškim in ženskim spolom (npr. razlike v sistemski toksičnosti, metabolizmu, biološki razpoložljivosti, toksičnosti za kostni mozeg itd., vključno na primer v študiji za ugotavljanje območja), je treba spodbujati uporabo obeh spolov. V takem primeru je študijo primerno izvajati na živalih obeh spolov, npr. kot del toksikološke študije s ponavljajočim odmerkom. V primeru uporabe obeh spolov je primerno uporabiti zasnovo preskusa z več dejavniki. Podrobnosti o tem, kako analizirati podatke z uporabo te zasnove, so navedene v Dodatku 2.

Ob začetku študije je treba določiti skupine, v katerih je vsaj 5 živali enega spola ali vsakega od spolov, če se uporabljata oba, ki jih je mogoče analizirati, na skupino. Kadar bi bila lahko izpostavljenost ljudi kemikalijam omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih izdelkih, je treba preskus opraviti na živalih ustreznega spola. Praviloma je za študijo kostnega mozga, izvedeno v skladu s parametri iz odstavka 37 s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolo (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali enega spola), potrebnih od 25 do 35 živali.

Velikost odmerkov

Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (27). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer s povzročitvijo upočasnitve pridobivanja telesne teže ali citotoksičnosti za hematopoetski sistem, ne pa smrti ali znakov bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (28)).

Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči toksičnost za kostni mozeg (npr. zmanjšanje deleža nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti v kostnem mozgu ali periferni krvi za več kot 50 %, vendar ne za manj kot 20 % kontrolne vrednosti). Vendar se pri analiziranju CD71-pozitivnih celic v perifernem krvnem obtoku (npr. s pretočno citometrijo) ta zelo mlada frakcija nezrelih eritrocitov hitreje odziva na toksične učinke kot večja RNK-pozitivna kohorta nezrelih eritrocitov. Zato je lahko pri proučevanju frakcije CD71-pozitivnih nezrelih eritrocitov z zasnovami akutne izpostavljenosti vidna višja očitna toksičnost v primerjavi s tistimi, pri katerih se nezreli eritrociti opredelijo na podlagi vsebnosti RNK. Kadar tretiranje pri poskusih traja pet dni ali manj, se zato lahko najvišja velikost odmerka preskusnih kemikalij, ki povzroča toksičnost, opredeli kot odmerek, ki povzroča statistično značilno zmanjšanje deleža CD71-pozitivnih nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti, vendar ne na manj kot 5 % vrednosti v kontroli (29).

▼M7

Kemikalije, ki kažejo nasičenost toksikokinetičnih lastnosti ali povzročajo procese razstrupljanja, zaradi katerih se lahko po dolgotrajnem tretiranju zmanjša izpostavljenost, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.

Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za ugotavljanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, je največji odmerek za 14- ali večdnevno obdobje dajanja kemikalije 1 000 mg/kg telesne teže na dan, za manj kot 14-dnevno obdobje dajanja kemikalije pa 2 000 mg/kg telesne teže na dan. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (kostni mozeg) opazi pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo.

Mejni preskus

Če poskusi za ugotavljanje območja odmerka ali obstoječi podatki iz povezanih živalskih sevov kažejo, da režim tretiranja z vsaj mejnim odmerkom (opisan v nadaljevanju) ne povzroči vidnih toksičnih učinkov (tudi brez upočasnitve proliferacije kostnega mozga ali drugih dokazov o citotoksičnosti za ciljno tkivo), ter če genotoksičnost na podlagi *in vitro* študij genotoksičnosti ali podatkov o strukturno sorodnih kemikalijah ni pričakovana, ni potrebna popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov, če se dokaže, da preskusne kemikalije dosežejo ciljno tkivo (kostni mozeg). V takih primerih morda zadostuje že ena velikost odmerka pri mejnem odmerku. Kadar se kemikalija daje 14 dni ali več, je mejni odmerek 1 000 mg/kg telesne teže na dan. Pri obdobju odmerjanja, krajšem od 14 dni, je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, topično podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem, intratrahealno ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo v splošnem ni priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (glej odstavek 37). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri višjih koncentracijah običajno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim nižji ravni, da se zagotovi konstanten volumen glede na telesno težo pri vseh odmerkih.

▼M7

Časovni razpored tretiranja

Po možnosti se izvedeta 2 tretiranji ali več s preskusno kemikalijo, ki se daje v 24-urnih intervalih, zlasti kadar je ta preskus vključen v druge študije toksičnosti. Druga možnost je dajanje posamičnih odmerkov, če je to znanstveno utemeljeno (npr. če je za preskusne kemikalije znano, da zavirajo celični cikel). Preskusne kemikalije se lahko dajejo tudi v razdeljenem odmerku, kar pomeni dva ali več odmerkov v istem dnevu na največ 2 do 3 ure, s čimer se olajša dajanje velike količine kemikalije. V teh okoliščinah ali v primeru dajanja preskusne kemikalije z vdihavanjem je treba čas vzorčenja načrtovati glede na čas zadnjega odmerka ali konca izpostavljenosti.

Preskus na miših ali podganah se lahko izvede na enega od naslednjih treh načinov:

a. Živali se s preskusno kemikalijo tretirajo enkrat. Vzorci kostnega mozga se odvzamejo najmanj dvakrat (iz neodvisnih skupin živali), in sicer vsaj 24 ur in najpozneje 48 ur po tretiranju, z ustreznimi intervali med vzorci, razen če je znano, da ima kemikalija izjemno dolg razpolovni čas. Vzorčenje, izvedeno prej kot 24 ur po tretiranju, je treba utemeljiti. Vzorci periferne krvi se odvzamejo vsaj dvakrat (iz iste skupine živali), in sicer vsaj 36 ur in najpozneje 72 ur po tretiranju, z ustreznimi intervali med vzorčenji. Pri prvem času vzorčenja je treba tretirati vse skupine, ki prejemajo odmerke, in vzeti vzorce za analizo; pri poznejših časih vzorčenja pa je treba dati le najvišje odmerke. Če se pri enem času vzorčenja odkrije pozitiven odziv, dodatno vzorčenje ni potrebno, razen če so potrebne kvantitativne informacije o razmerju med odmerkom in odzivom. Opisani odvzem celic je posledica kinetike pojava in izginjanja mikronukleusov v teh dveh tkivnih prostorih.

b. Pri dveh dnevnih odmerkih (kar pomeni dva odmerka na 24 ur) je treba vzorce kostnega mozga odvzeti enkrat med 18 in 24 ur po zadnjem tretiranju, vzorce periferne krvi pa enkrat med 36 in 48 ur po zadnjem tretiranju (30). Opisani odvzem celic je posledica kinetike pojava in izginjanja mikronukleusov v teh dveh tkivnih prostorih.

c. Pri treh ali več dnevnih odmerkih (kar pomeni tri ali več odmerkov na približno 24 ur) je treba vzorce kostnega mozga odvzeti najpozneje 24 ur po zadnjem tretiranju, vzorce periferne krvi pa najpozneje 40 ur po zadnjem tretiranju (31). V to možnost tretiranja je vključena kombinacija kometnega preskusa (kar pomeni vzorčenje 2 do 6 ur po zadnjem tretiranju) s preskusom mikronukleusov in vključitev preskusa mikronukleusov v študijo toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki. Iz zbranih podatkov je bilo razvidno, da je v teh širših časovnih okvirih pri 3 ali več odmerkih kemikalije opaziti nastajanje mikronukleusov (15).

Uporabljajo se lahko tudi drugi režimi odmerjanja in vzorčenja, če so ustrezni in znanstveno utemeljeni, da se olajša povezovanje z drugimi študijami toksičnosti.

Opazovanja

Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in zabeležiti klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden

▼M7

izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba humano evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (28). Pod določenimi pogoji se lahko spremlja telesna temperatura živali, saj sta v nastajanje napačnih rezultatov vključeni hiper- in hipotermija, ki ju povzroči tretiranje (32) (33) (34).

Izpostavljenost ciljnega tkiva

Ob ustreznih časih je treba odvzeti vzorec krvi, da se lahko preišče raven preskusnih kemikalij v plazmi, s čimer se dokaže, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga, če je to utemeljeno in če ne obstajajo drugi podatki o izpostavljenosti (glej odstavek 48).

Priprava kostnega mozga/krvi

Takoj po humani evtanaziji se celice kostnega mozga običajno pridobijo iz stegnenic ali golenic živali. Celice se običajno odstranijo, preparirajo in obarvajo z uporabo uveljavljenih metod. Majhne količine periferne krvi se lahko v skladu z ustreznimi standardi dobrobiti živali pridobijo z metodo, ki omogoča preživetje poskusne živali, kot je s puščanjem krvi iz repne vene ali druge primerne žile, ali pa s punkcijo srca ali vzorčenjem iz velike žile pri evtanaziji živali. Pri kostnem mozgu ali eritrocitih iz periferne krvi se lahko celice glede na metodo analize takoj supravitalno obarvajo (16) (17) (18) ali pa se pripravijo razmazi, ki se nato obarvajo za mikroskopijo ali fiksirajo in ustrezno obarvajo za analizo s pretočnim citometrom. Uporaba DNK-specifičnega barvila [npr. akridin oranž (35) ali Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] lahko prepreči nastajanje nekaterih artefaktov, povezanih z uporabo barvila, ki ni DNK-specifično. Kljub tej prednosti pa se lahko uporabijo običajna barvila (npr. Giemsa za mikroskopsko analizo). Lahko se uporabijo tudi dodatni sistemi [npr. celulozne kolone za odstranitev celic z jedri (37) (38)], če je bilo dokazano, da so ti sistemi združljivi s pripravo vzorcev v laboratoriju.

Če se uporabljajo te metode, se lahko za opredelitev narave mikronukleusov (kromosom/fragment kromosoma) uporabijo antikinetohorna protitelesa (39), fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) s pancentromernimi DNK-sondami (40) ali označevanje začetnih oligonukleotidov *in situ* s premazi, specifičnimi za centromere, skupaj z ustreznim nasprotnim barvanjem DNK (41), zato da se določi, ali mehanizem nastajanja mikronukleusov povzroča klastogena in/ali anevgena dejavnost. Za razlikovanje med anevgeni in klastogeni se lahko uporabijo druge metode, če so se izkazale za učinkovite.

Analiza (ročna in avtomatizirana)

Vse mikroskopske preparate ali vzorce, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba pred analizo neodvisno označiti in naključno razdeliti, tako da oseba, ki beleži ugotovitve, ne pozna pogojev tretiranja; če se uporablja avtomatiziran sistem štetja, ki se ne opira na vizualne preglede in nanj izvajalec ne more vplivati, tako označevanje ni potrebno. Za vsako žival se določi delež nezrelih eritrocitov med vsemi (nezrelimi + zrelimi) eritrociti, tako da se prešteje skupno vsaj 500 eritrocitov pri kostnem mozgu in 2 000 eritrocitov pri periferni krvi (42). V določanje pojavnosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi je treba vključiti vsaj 4 000 nezrelih eritrocitov na žival (43). Če je v zbirki podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov v preskusnem laboratoriju srednja vrednost pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi v ozadju < 0,1 %, je treba razmisliti o štetju dodatnih celic. Pri analiziranju vzorcev delež nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti v tretiranih živalih pri štetju z

▼M7

mikroskopijo ne sme biti nižji od 20 % deleža v kontroli z vehiklom/topilom, pri štetju CD71-pozitivnih nezrelih eritrocitov s citometričnimi metodami pa nižji od približno 5 % deleža v kontroli z vehiklom/topilom (glej odstavek 31) (29). Če je na primer pri preskusu kostnega mozga pri štetju z mikroskopijo kontrolni delež nezrelih eritrocitov v kostnem mozgu 50 %, je zgornja meja toksičnosti enaka 10 % nezrelih eritrocitov.

Ker vranica podgane zadrži in uniči eritrocite z mikronukleusi, je za vzdrževanje visoke občutljivosti poskusa pri analiziranju periferne krvi podgane analizo nezrelih eritrocitov z mikronukleusi bolje omejiti na najmlajšo frakcijo. Pri metodah za avtomatizirano analizo je mogoče te najbolj nezrele eritrocite opredeliti na podlagi njihove visoke vsebnosti RNK ali visoke ravni receptorjev transferina (CD71-pozitivni), izraženih na njihovi površini (31). Vendar je neposredna primerjava različnih metod obarvanja pokazala, da je zadovoljive rezultate mogoče dobiti z različnimi metodami, vključno z običajnim barvanjem z barvilom akridin oranž (3) (4).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako analizirano žival posebej je treba navesti število štetih nezrelih eritrocitov, število nezrelih eritrocitov z mikronukleusi in število nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti. Kadar se miši tretirajo neprekinjeno 4 tedne ali več, je treba navesti tudi podatke o številu in deležu zrelih eritrocitov z mikronukleusi, če so zbrani. Sporočiti je treba tudi podatke o toksičnosti za živali in klinične znake.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili:

a. podatki o sočasni negativni kontroli se štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov (glej odstavke 15 do 18);

b. sočasne pozitivne kontrole ali kontrole za štetje morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo (glej odstavka 24 in 25);

c. analizirano je ustrezno število odmerkov in celic;

d. merila za izbor najvišjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 30 do 33.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

a. se pri vsaj eni od tretiranih skupin pokaže statistično značilno povečanje pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b. je to povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c. je kateri koli od teh rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi).

▼M7

Če se pri določenem času vzorčenja prouči le najvišji odmerek, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če obstaja statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo in so rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi). Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (44) (45) (46) (47). Pri analizi razmerja med odmerkom in odzivom je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke. V statističnih preskusih se kot poskusna enota uporabi žival. Pozitivni rezultati pri preskusu mikronukleusov kažejo, da preskusna kemikalija povzroča nastanek mikronukleusov, ki so posledica poškodb kromosomov ali mitotičnega aparata v eritroblastih preskušane vrste. Če je preskus izveden za odkrivanje centromer v mikronukleusih, je preskusna kemikalija, ki povzroča nastanek mikronukleusov s centromerami (centromerne DNK ali kinetohora, ki so znak izgube celih kromosomov), dokaz, da je preskusna kemikalija anevgen.

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev:

a. pri nobeni tretirani skupini ne pokaže statistično značilno povečanje pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b. pri katerem koli času vzorčenja ne pojavi z odmerkom povezano povečanje, če se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c. so vsi rezultati znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi) ter

d. se je pojavila izpostavljenost kostnega mozga preskusnim kemikalijam.

Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (44) (45) (46) (47). Dokazi o izpostavljenosti kostnega mozga preskusni kemikaliji lahko vključujejo zmanjšanje razmerja nezrelih eritrocitov ali meritve ravni preskusne kemikalije v plazmi ali krvi. Pri intravenoznem dajanju dokaz o izpostavljenosti ni potreben. Druga možnost za dokaz izpostavljenosti kostnega mozga je uporaba podatkov ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion – absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje), pridobljenih v neodvisni študiji, ki je bila opravljena z enakim načinom izpostavljenosti in istimi vrstami. Negativni rezultati pomenijo, da preskusna kemikalija pri preskusnih pogojih ne povzroča nastanka mikronukleusov v nezrelih eritrocitih preskušane vrste.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

V primerih, ko odziv ni jasno negativen ali pozitiven, in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje), je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami zaključenih obstoječih poskusov. V nekaterih primerih je koristno, če se analizira več celic ali poskus ponovi s spremenjenimi preskusnimi pogoji.

Podatki v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav ne omogočajo sklepa o tem, ali preskusna kemikalija povzroča pozitivne ali negativne rezultate, zato se zaključi, da je odziv dvoumen.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Povzetek

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

▼M7

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Priprava preskusne kemikalije:

— utemeljitev izbire vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;

— priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;

— analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če je na voljo.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;

— število, starost in spol živali;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— metoda edinstvene identifikacije živali;

— pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo dlje kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

— podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);

— podatki iz študije za ugotavljanje območja, če je bila izvedena;

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— utemeljitev načina in trajanja dajanja kemikalije;

— metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla krvni obtok ali ciljno tkivo;

▼M7

— dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže na dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in poraba hrane/pitne vode, če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— metoda za evtanazijo;

— metoda za analgezijo (če se uporablja);

— podroben opis časovnega razporeda tretiranj in vzorčenj ter utemeljitev izbir;

— metode za pripravo preparatov;

— postopki za izolacijo in hrambo vzorcev;

— metode za merjenje toksičnosti;

— merila za štetje nezrelih eritrocitov z mikronukleusi;

— število analiziranih celic na žival pri določanju pogostosti nezrelih eritrocitov z mikronukleusi in za določanje deleža nezrelih eritrocitov glede na zrele;

— merila za sprejemljivost študije;

— metode, kot so uporaba antikinetohornih protiteles ali centromernih DNK-sond, da se ugotovi, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali njihove fragmente, če je ustrezno.

Rezultati:

— stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;

— delež nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti;

— število nezrelih eritrocitov z mikronukleusi, navedeno za vsako žival posebej;

— srednja vrednost ± standardni odklon nezrelih eritrocitov z mikronukleusi na skupino;

— razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;

— uporabljene statistične analize in metode;

— podatki o sočasnih negativnih in pozitivnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

— podatki o negativnih in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni in 95-odstotne kontrolne meje za porazdelitev ter obravnavano časovno obdobje in število opazovanj;

— podatki, ki dokazujejo, da je prišlo do izpostavljenosti kostnega mozga;

— podatki, s katerimi se ugotovi, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali njihove fragmente, če je ustrezno;

— izpolnjena merila za pozitivni ali negativni odziv.

▼**M7**

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

Viri

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Hayashi, M. idr. (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 627/1, str. 10–30.

(3) MacGregor, J. T. idr. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, zv. 94/1, str. 92–107.

(4) Dertinger, S. D. idr. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, zv. 94/1, str. 83–91.

(5) Dertinger, S. D. idr. (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, zv. 26/1, str. 139–145.

(6) Parton, J. W., Hoffman, W. P. in Garriott, M. L. (1996). Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, zv. 370/1, str. 65–73.

(7) Asano, N. idr. (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 404/1–2, str. 149–154.

(8) Styles, J. A. idr. (2001). Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, zv. 44/2, str. 153–155.

(9) Heddle, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 18/2, str. 187–190.

(10) Schmid, W. (1975). The micronucleus test, Mutation Research, zv. 31/1, str. 9–15.

(11) Heddle, J. A. idr. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, zv. 123/1, str. 61–118.

(12) Mavournin, K. H. idr. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, zv. 239/1, str. 29–80.

(13) MacGregor, J. T. idr. (1983). Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, zv. 11, str. 555–558.

▼M7

(14) MacGregor, J. T. idr. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, zv. 189/2, str. 103–112.

(15) MacGregor, J. T. idr. (1990). The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, zv. 14/3, str. 513–522.

(16) Hayashi, M. idr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/Genetic Toxicology, zv. 245/4, str. 245–249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, zv. 278/2–3, str. 83–98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, zv. 10/3, str. 153–159.

(19) Salamone, M. F. in Mavournin, K. H. (1994). Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, zv. 23/4, str. 239–273.

(20) Krishna, G., Urda, G. in Paulissen, J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 453/1, str. 45–50.

(21) Hayes, J. idr. (2009). The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power, Mutagenesis, zv. 24/5, str. 419–424.

(22) Wakata, A. idr. (1998). Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, zv. 32/1, str. 84–100.

(23) Ryan, T. P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement, druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 723/2, str. 87–90.

(25) Rothfuss, A. idr. (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 723/2, str. 108–120.

(26) Hayashi, M. idr. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, zv. 312/3, str. 293–304.

(27) Fielder, R. J. idr. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, zv. 7/5, str. 313–319.

▼M7

(28) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 19, OECD Publishing, Pariz.

(29) LeBaron, M. J. idr. (2013). Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, zv. 54/3, str. 222–228.

(30) Higashikuni, N. in Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 +/– 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, zv. 10/4, str. 313–319.

(31) Hayashi, M. idr. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, zv. 35/3, str. 234–252.

(32) Asanami, S. in Shimono, K. (1997). High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 390/1–2, str. 79–83.

(33) Asanami, S., Shimono, K. in Kaneda, S. (1998). Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 413/1, str. 7–14.

(34) Spencer, P. J. idr. (2007). Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, zv. 97/1, str. 120–127.

(35) Hayashi, M., Sofuni, T. in Ishidate Jr., M. (1983). An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, zv. 120/4, str. 241–247.

(36) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. in Langlois, R. G. (1983). A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, zv. 120/4, str. 269–275.

(37) Romagna, F. in Staniforth, C. D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, zv. 213/1, str. 91–104.

(38) Sun, J. T., Armstrong, M. J. in Galloway, S.M. (1999). Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, zv. 439/1, str. 121–126.

(39) Miller, B. M. in Adler, I. D. (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, zv. 5/4, str. 411–415.

(40) Miller, B. M. idr. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, zv. 6/4, str. 297–302.

(41) Russo, A. (2002). PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, zv. 107/2, str. 99–104.

(42) Gollapudi, B. B. in McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, zv. 347/2, str. 97–99.

(43) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 198, OECD Publishing, Pariz.

▼**M7**

(44) Richold, M. idr. (1990). In Vivo Cytogenetics Assays, v Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 115–141.

(45) Lovell, D. P. idr. (1989). Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 184–232.

(46) Hayashi, M. idr. (1994). Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, zv. 102/Dop. 1, str. 49–52.

(47) Kim, B. S., Cho, M. in Kim, H. J. (2000). Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, zv. 469/2, str. 233–241.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Eritroblast: zgodnja stopnja razvoja eritrocita, takoj pred nezrelim eritrocitom, v kateri celica še vedno vsebuje jedro.

Kinetohor: beljakovinska struktura, ki nastane na centromeri evkariotskih celic in povezuje kromosom mikrotubulnimi polimeri iz mitotskega vretena med mitozo in mejozo ter deluje med delitvijo celic, da loči sestrske kromatide.

Mikronukleusi: majhna jedra, ki se nahajajo poleg glavnega jedra celic in so od njega ločena ter nastanejo med telofazo mitoze (mejoze) iz zaostalih fragmentov kromosomov ali celih kromosomov.

Normokromatski ali zrel eritrocit: popolnoma zrel eritrocit, ki je izgubil ostanek RNK, ki ostane po enukleaciji (izločitvi jedra), in/ali ostale kratkožive celične označevalce, ki značilno izginejo po enukleaciji po končni delitvi eritroblasta.

Polikromatski ali nezrel eritrocit: novonastali eritrocit na vmesni stopnji razvoja, ki se zaradi prisotnosti ostanka RNK v novonastalih celicah obarva z modrimi in rdečimi sestavinami pri klasični tehniki barvanja krvnih razmazov, kot je barvanje po Wright-Giemsi. Take novonastale celice so približno enake kot retikulociti, ki postanejo vidni z uporabo supravitalnega obarvanja, zaradi katerega se ostanek RNK nakopiči v retikulumu. Za določanje novonastalih rdečih krvničk se pogosto uporabljajo druge metode, vključno z monokromatskim barvanjem RNK s fluorescentnimi barvili ali označevanjem s kratkoživimi površinskimi označevalci, kot je CD71 s fluorescentnimi protitelesi. Polikromatski eritrociti, retikulociti in CD71-pozitivni eritrociti so nezreli eritrociti, čeprav ima vsak od njih nekoliko drugačno razdelitev po starosti celice.

Retikulocit: novonastali eritrocit, obarvan s supravitalnim barvilom, zaradi katerega se ostanek celične RNK nakopiči v značilnem retikulumu. Retikulociti in polikromatski eritrociti imajo podobno razdelitev po starosti celice.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M7

Dodatek 2

ZASNOVA PRESKUSA Z VEČ DEJAVNIKI ZA OPREDELITEV RAZLIK MED SPOLOMA PRI PRESKUSU KROMOSOMSKIH ABERACIJ *IN VIVO*

Zasnova preskusa z več dejavniki in analiza v njenem okviru

Pri tej zasnovi se preskusi vsaj 5 živali moškega in vsaj 5 živali ženskega spola pri vsaki koncentraciji, tako da se uporabi vsaj 40 živali (20 moškega in 20 ženskega spola ter ustrezne pozitivne kontrole).

Ta zasnova, ki je ena enostavnejših zasnov preskusa z več dejavniki, je enakovredna dvosmerni analizi variance, pri čemer sta glavna učinka spol in koncentracija. Podatki se lahko analizirajo z različnimi standardnimi statističnimi programskimi paketi, kot so SPSS, SAS, STATA, Genstat, ter z uporabo programskega jezika R.

Z analizo se variabilnost v naboru podatkov popolnoma razvrsti v variabilnost med spoloma, variabilnost med koncentracijami in variabilnost, povezano z medsebojnim vplivom med spoloma in koncentracijami. Vsak pogoj se preskusi glede na oceno variabilnosti med živalmi iz ponovljenih preskusov v skupinah živali istega spola pri isti koncentraciji. Celotne podrobnosti osnovne metodologije so na voljo v številnih standardnih statističnih učbenikih (glej vire) in pomoči uporabnikom, ki jo zagotavljajo statistični paketi.

Analiza se začne s pregledom pogojev medsebojnega vpliva „spol x koncentracija“ v preglednici z analizo variance ([1]). Če ni precejšnjega medsebojnega vpliva, zagotavljajo skupne vrednosti za spola ali koncentracije veljavne statistične preskuse med koncentracijami, ki temeljijo na združenem vplivu variabilnosti znotraj skupine v preglednici z analizo variance.

Analiza se nadaljuje s popolno razvrstitvijo ocene med variabilnostjo koncentracij v kontraste, s čimer se zagotovi preskus za linearne in kvadratne kontraste odzivov med različnimi koncentracijami. Če „spol x koncentracija“ kaže znaten medsebojni vpliv, se lahko ta vpliv popolnoma razvrsti v medsebojne vplive „linearni kontrast x spol“ in „kvadratni kontrast x spol“. S temi vplivi se zagotavljajo preskusi tega, ali so odzivi na koncentracije za oba spola vzporedni ali pa so odzivi med spoloma različni.

Ocena združene variabilnosti znotraj skupine se lahko uporabi za pare preskusov v zvezi z razlikami med srednjimi vrednostmi. Te primerjave se lahko naredijo med srednjimi vrednostmi za oba spola in med srednjimi vrednostmi za različne koncentracije, kot na primer za primerjave s stopnjami v negativnih kontrolah. V primerih z znatnim medsebojnim vplivom se lahko primerjajo srednje vrednosti različnih koncentracij pri istem spolu ali srednje vrednosti obeh spolov pri isti koncentraciji.

Viri

Obstajajo številni statistični učbeniki, v katerih se razpravlja o teoriji, zasnovi, metodologiji, analizi in razlagi zasnove preskusov z več dejavniki, ki se gibljejo od najenostavnejših analiz z dvema dejavnikoma do bolj zapletenih oblik, uporabljenih v metodologiji zasnove poskusov. Naslednji seznam ni izčrpen. V nekaterih knjigah so obdelani primeri primerljivih zasnov, ki imajo v nekaterih primerih kodo za izvajanje analize z uporabo različnih programskih paketov.

([1]) Statistiki, ki uporabljajo pristop modeliranja, kot so splošni linearni modeli, lahko analizo začnejo na drugačen, a primerljiv način, vendar ne bodo nujno izpeljali običajne preglednice z analizo variance, ki sega v čas algoritemskih pristopov k izračunavanju statističnih podatkov, razvitih v predračunalniški dobi.

▼**M7**

Box, G. E. P, Hunter, W. G. in Hunter, J. S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box, G. E. P. in Draper, N. R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C. P. in Davey, A. J. H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery, D. C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B. J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C. F. J in Hamada, M. S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14 **MUTAGENOST: PREIZKUS POVRATNE MUTACIJE PRI BAKTERIJAH**

1. **METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 UVOD

Pri preizkusu bakterijskih povratnih mutacij se sevi vrst *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli,* ki potrebujejo aminokisline, uporabljajo za odkrivanje točkovnih mutacij, ki vključujejo substitucijo, adicijo ali delecijo enega ali nekaj baznih parov DNA (1) (2) (3). Princip tega preizkusa bakterijskih povratnih mutacij je, da zazna mutacije, ki obrnejo mutacije v preizkusnih sevih in obnovijo funkcionalno sposobnost bakterij za sintezo osnovne aminokisline. Povratno mutirane bakterije se zaznajo po sposobnosti rasti v odsotnosti aminokisline, ki jo starševski preizkusni sev potrebuje.

Točkovne mutacije so vzrok številnih genskih bolezni pri človeku in obstajajo tehtni dokazi, da so točkovne mutacije onkogenov in genov, zaviralcev rasti tumorjev somatskih celic, povezane z nastankom tumorjev pri človeku in poskusnih živalih. Preizkus bakterijskih povratnih mutacij je hiter, poceni in relativno lahko izvedljiv. Mnogi preizkusni sevi imajo več značilnosti, zaradi katerih so občutljivejši za zaznavanje mutacij, vključno z odzivnimi zaporedji DNA na mestih povratnih mutacij, povečano prepustnostjo celice za velike molekule in odstranitvijo DNA-popravljalnih mehanizmov ali okrepitvijo procesov popravljanja DNA, podvrženega napakam. Specifičnost preizkusnih sevov lahko da koristne informacije o vrstah mutacij, ki jih povzročijo genotoksične snovi. Na voljo je obsežna baza rezultatov za preizkuse bakterijskih povratnih mutacij za številne strukture in razvite so bile dobro uveljavljene metodologije za preizkušanje kemikalij z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, vključno s hlapnimi spojinami.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Preizkus povratnih mutacij pri vrsti *Salmonella typhimurium* ali *Escherichia coli* zazna mutacijo pri sevu, ki potrebuje aminokislino (histidin oziroma triptofan), s katero nastane sev, neodvisen od zunanje oskrbe z aminokislino.

Mutageni substitucije baznih parov so snovi, ki povzročijo zamenjavo baz v DNA. Pri preizkusu povratne mutacije takšna zamenjava lahko nastane na mestu izvirne mutacije ali na drugem mestu bakterijskega genoma.

Mutageni premika bralnega okvira so snovi, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov DNA in tako spremenijo bralni okvir RNA.

▼B

1.3 ZAČETNI PREUDARKI

Pri preizkusu bakterijskih povratnih mutacij se uporabljajo prokariontske celice, ki se od sesalskih razlikujejo v lastnostih, kakor so sprejemanje, presnova, kromsomska struktura in procesi popravljanja DNA. Za preizkuse, opravljene *in vitro,* so navadno potrebni zunanji viri aktivacije presnove. Sistemi aktivacije presnove *in vitro* ne morejo povsem posnemati razmer *in vivo* pri sesalcih. Preizkus torej ne daje neposrednih informacij o mutagenosti in rakotvornosti snovi pri sesalcih.

Preizkus bakterijskih povratnih mutacij se splošno uporablja kot začetno presejanje za odkrivanje genotoksičnega delovanja in zlasti delovanja, ki povzroči točkovne mutacije. Obsežna baza podatkov je pokazala, da mnoge kemikalije, ki pri tem preizkusu dajo pozitivni rezultat, kažejo mutageno delovanje tudi pri drugih preizkusih. Obstajajo primeri mutagenov, ki jih ta preizkus ne zazna; razlogi za te pomanjkljivosti se lahko pripišejo posebni naravi zaznane končne točke, razlikam v aktivaciji presnove ali razlikam v biološki razpoložljivosti. Po drugi strani pa lahko dejavniki, ki povečajo občutljivost preizkusa bakterijskih povratnih mutacij, privedejo do precenitve mutagenega delovanja.

Preizkus bakterijskih povratnih mutacij morda ne bo primeren za ocenjevanje nekaterih skupin nevarnih kemikalij, na primer močno baktericidnih spojin (npr. nekaterih antibiotikov) in tistih, za katere se domneva (ali ve), da motijo sistem podvojevanja prav v sesalskih celicah (npr. nekateri inhibitorji topoizomeraze in nekateri nukleozidni analogi). Pri takšnih primerih bi bili lahko bolj primerni preizkusi mutacij pri sesalcih.

Čeprav so mnoge spojine, pri katerih je rezultat tega preizkusa pozitiven, rakotvorne snovi za sesalce, soodvisnost ni absolutna. Odvisna je od skupine nevarnosti kemikalije in obstajajo rakotvorne snovi, ki jih ta preizkus ne zazna, ker delujejo prek drugih mehanizmov, ki niso genotoksični, ali mehanizmov, ki jih v bakterijskih celicah ni.

1.4 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Suspenzije bakterijskih celic se izpostavijo preizkušam snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti zunanjega sistema za aktivacijo presnove. Pri metodi vključitve v ploščo se te suspenzije zmešajo s poltrdim gojiščem in takoj razlijejo po minimalnem gojišču. Pri metodi poprejšnje inkubacije se obdelovalna zmes inkubira in nato zmeša s poltrdim gojiščem pred nanosom na minimalno gojišče. Pri obeh tehnikah se po dveh ali treh dneh inkubacije preštejejo kolonije povratnih mutant in primerjajo s številom kolonij spontanih povratnih mutant na kontrolnih ploščah s topilom.

Opisanih je nekaj postopkov za izvedbo preizkusa bakterijskih povratnih mutacij. Med splošno uporabljanimi so metoda vključitve v ploščo (1) (2) (3) (4), metoda poprejšnje inkubacije (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuacijska metoda (9) (10) in suspenzijska metoda (11). Opisane so tudi prilagoditve za preizkušanje plinov ali hlapov (12).

▼B

Postopki, opisani v metodi, veljajo predvsem za metodo vključitve v ploščo in metodo poprejšnje inkubacije. Obe sta sprejemljivi za izvajanje preizkusa ob aktivaciji presnove in brez nje. Nekatere snovi se lahko učinkoviteje zaznajo z metodo poprejšnje inkubacije. Te snovi sodijo v skupine nevarnih kemikalij, ki vključujejo kratkoverižne alifatske nitrozamine, dvovalentne kovine, aldehide, azo barvila in diazo spojine, pirolizidinske alkaloide ter alil in nitro spojine (3). Priznano je tudi, da se pri uporabi standardnih postopkov, kakor sta metoda vključitve v ploščo ali metoda poprejšnje inkubacije, nekatere skupine mutagenov ne zaznajo vedno. Ti naj se obravnavajo kot „posebni primeri“ in močno se priporoča, da se za njihovo zaznavanje uporabijo nadomestni postopki. Določijo se lahko naslednji „posebni primeri“ (skupaj s primeri postopkov, ki bi se lahko uporabili za njihovo zaznavanje): azo barvila in diazo spojine (3) (5) (6) (13), plini in hlapne kemikalije (12) (14) (15) (16) ter glikozidi (17) (18). Odstopanje od standardnega postopka je treba znanstveno utemeljiti.

1.5 OPIS PRESKUSNE METODE

1.5.1 **Priprave**

1.5.1.1. *Bakterije*

Sveže kulture bakterij se vzgojijo do pozne logaritemske faze ali zgodnje stacionarne faze rasti (približno 109 celic na ml). Kulture v pozni stacionarni fazi naj se ne uporabljajo. Kulture, ki se uporabijo v preizkusu, morajo obvezno imeti velik delež živih bakterij. Delež se lahko dokaže na podlagi podatkov o rastnih krivuljah iz preteklih kontrol ali pri vsakem preizkusu z določitvijo števila živih celic s štetjem na plošči.

Priporočena temperatura inkubacije je 37 °C.

Uporabi naj se vsaj pet sevov bakterij. Ti naj vključujejo štiri seve vrste *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 ali TA97a ali TA97; TA98 in TA100), za katere je bilo dokazano, da so zanesljivi in dajejo ponovljive rezultate med laboratoriji. Ti štirje sevi vrste *S. typhimurium* imajo na primarnem mestu povratne mutacije bazne pare GC in znana je možnost, da ne zaznajo nekaterih oksidirajočih mutagenov, prečnih povezovalcev in hidrazinov. Takšne snovi lahko zaznajo sevi *E. coli* WP2 ali *S. typhimurium* TA102 (19), ki imajo na primarnem mestu povratne mutacije bazni par AT. Priporočena kombinacija sevov je torej:

— *S. typhimurium* TA1535 in

— *S. typhimurium* TA1537 ali TA97 ali TA97a in

— *S. typhimurium* TA98 in

— *S. typhimurium* TA100 in

— *E. coli* WP2 uvrA, ali *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), ali *S. typhimurium* TA102.

Da bi se zaznali prečno povezovalni mutageni, bi bilo morda bolj primerno vključiti TA102 ali dodati sev *E. coli,* zmožen popravljanja DNA [npr. *E. coli* WP2 ali *E. coli* WP2 (pKM101)].

▼B

Uporabljajo naj se uveljavljeni postopki za pripravo založne kulture, preverjanje označevalcev in shranjevanje. Potreba po aminokislinah za rast naj se dokaže za vsak pripravek zamrznjene založne kulture (histidin za seve *S. typhimurium* in triptofan za seve *E. coli).* Podobno naj se preverijo druge fenotipske značilnosti, namreč: navzočnost ali odsotnost R-plazmidov, kadar je to primerno [tj. odpornost proti ampicilinu pri sevih TA98, TA100 in TA97a ali TA97, WP2 uvrA in WP2 uvrA (pKM101), in odpornost proti ampicilinu + tetraciklinu pri sevu TA 102G; navzočnost značilnih mutacij (tj. mutacije rfa pri *S. typhimurium* prek občutljivosti za kri stal vijolično in mutacije uvrA pri *E. coli* ali mutacije uvrB pri *S. typhimurium* prek občutljivosti za ultravijolično svetlobo) (2) (3). Število kolonij spontanih povratnih mutant pri sevih naj bo v območjih pogostnosti, pričakovanih glede na pretekle kontrolne podatke laboratorija, in po možnosti v območju, navedenem v literaturi.

1.5.1.2 *Gojišče*

Uporabljata se ustrezno minimalno gojišče (ki vsebuje npr. minimalno gojišče E po Vogel-Bonnerju in glukozo) in poltrdo gojišče, ki vsebuje histidin in biotin ali triptofan, da se omogoči nekaj delitev celic (1) (2) (9).

1.5.1.3 *Aktivacija presnove*

Bakterije naj se izpostavijo preizkušam snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogosteje uporabljani sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem (S9), pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kakor je Aroclor 1254 (1) (2), ali z zmesjo fenobarbitona in β-naftoflavona (18) (20) (21). Postmitohondrij ska frakcija se navadno uporablja v koncentracijah od 5 do 30 % v/v v zmesi S9. Izbira in stanje sistema za aktivacijo presnove sta lahko odvisna od skupine nevarnosti preizkušane kemikalije. Včasih je primerno uporabiti več kakor eno koncentracijo postmitohondrijske frakcije. Pri azo barvilih in diazo spojinah bo morda bolj primerno uporabiti redukcijski sistem aktivacije presnove (6) (13).

1.5.1.4 *Preizkušana snov/priprava*

Trdne preizkušane snovi naj se pred obdelavo bakterij raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko dodajo neposredno v preizkusni sistem in/ali se pred obdelavo razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Topilo/nosilec naj ne vzbuja suma, da kemično reagira s preizkušano snovjo, in naj bo združljivo s preživetjem bakterij in delovanjem S9 (22). Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadar koli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca. Kadar se preizkušajo v vodi nestabilne snovi, naj se uporabijo brezvodna organska topila.

▼B

1.5.2 **Preizkusni pogoji**

1.5.2.1 *Preizkusni sevi (glej 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Koncentracije izpostavljenosti*

Med merili, ki jih je treba upoštevati pri določanju največje uporabljene količine preizkušane snovi, so citotoksičnost in topnost v končni obdelovalni zmesi.

Lahko je koristno, če se toksičnost in netopnost določita v poprejšnjem poskusu. Citotoksičnost se lahko zazna prek zmanjšanja števila kolonij povratnih mutant, čistine na bakterijskem ozadju ali zmanjšanja bakterijskega ozadja ali stopnje preživetja obdelanih kultur. Citotoksičnost snovi se lahko spremeni ob navzočnosti sistemov za aktivacijo presnove. Netopnost naj se oceni kot oborina v končni zmesi pri dejanskih pogojih preizkusa in naj bo vidna s prostim očesom.

Priporočena največja preizkusna koncentracija za topne necitotoksične snovi je 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo. Pri necitotoksičnih snoveh, ki niso topne pri koncentracijah 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo, naj bo ena ali več preizkušenih koncentracij netopnih v končni obdelovalni zmesi. Preizkušane snovi, ki so citotoksične že pri koncentracijah, manjših od 5 mg/ploščo ali 5 ul/ploščo, naj se preizkušajo do citotoksične koncentracije. Oborina ne sme vplivati na štetje.

Uporabi naj se vsaj pet različnih koncentracij preizkušane snovi, ki jih je mogoče analizirati, z intervalom približno pol log (tj. $\sqrt{10}$) med preizkusnimi točkami pri začetnem poskusu. Primerni so lahko manjši intervali, kadar se raziskuje odvisnost med koncentracijo in odzivom. Lahko se izvedejo preizkusi s koncentracijami, večjimi od 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo, kadar se ocenjujejo snovi, ki vsebujejo znatne količine potencialno mutagenih nečistot.

1.5.2.3 *Negativni in pozitivni kontrolni vzorci*

V vsak preizkus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo ali nosilec) kontrolni vzorci, specifični za sev, ob aktivaciji presnove in brez nje. Izberejo naj se koncentracije pozitivne kontrole, ki dokazujejo učinkovito izvedbo vsakega preizkusa.

Pri preizkusih, pri katerih se uporabi sistem aktivacije presnove, naj se referenčna(-e) snov(-i) pozitivne kontrole izbere(-jo) na podlagi vrste uporabljenih bakterijskih sevov.

Naslednje snovi so primeri ustreznih snovi pozitivne kontrole za preizkuse z aktivacijo presnove:

Št. CAS	Št. Einecs	Snovi
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantracen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenzo(a) antracen
50-32-8	200-028-5	benzo[a]piren
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracen

▼B

Št. CAS	Št. Einecs	Snovi
50-18-0		ciklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	ciklofosfamid monohidrat

Naslednja snov je ustrezna snov pozitivne kontrole za metodo redukcijske aktivacije presnove:

Št. CAS	Št. Einecs	Snovi
573-58-0	209-358-4	Kongo rdeče

2-aminoantracen naj se ne uporablja kot edini kazalec učinkovitosti zmesi S9. Če se uporabi 2-aminoantracen, naj bo tudi za vsako serijo S9 značilen mutagen, ki potrebuje aktivacijo presnove z mikrosomskimi encimi, npr. benzo[a]piren, dimetilbenzo antracen.

Naslednje snovi so primeri snovi pozitivne kontrole za posamezne seve, za preizkuse, izvedene brez zunanjega sistema aktivacije presnove:

Št. CAS	Št. Einecs	Snovi	Sev
26628-22-8	247-852-1	natrijev azid	TA 1535 in TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridin	TA 1537, TA 97 in TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 in TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumol hidroperoksid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicin C	WP2 uvrA in TAl 02
70-25-7	200-730-1	N-metil-N-nitro-N-nitrozog-vanidin	WP2, WP2uvrA in WP2uvrA(pK M101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrokinolin-1-oksid	WP2, WP2uvrA in WP2uvrA(pK M101)
3688-53-7		furilfuramid (AF2)	sevi s plazmidi

Lahko se uporabijo druge ustrezne referenčne snovi pozitivne kontrole. Uporabijo naj se kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isto skupino nevarnosti kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo.

Vključijo naj se negativni kontrolni vzorci, ki jih sestavlja le topilo ali nosilec brez preizkušane snovi, obdelani na enak način kakor obdelovalne skupine. Uporabijo se tudi neobdelani kontrolni vzorci, razen če pretekli kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

▼B

1.5.3 **Postopek**

Pri metodi vključitve v ploščo (1) (2) (3) (4) brez aktivacije presnove se navadno 0,05 ml ali 0,1 ml preizkušane raztopine, 0,1 ml sveže bakterijske kulture (ki vsebuje približno 108 živih celic) in 0,5 ml sterilnega pufra zmeša z 2,0 ml poltrdega gojišča. Pri preizkusu z aktivacijo presnove se navadno 0,5 ml zmesi za aktivacijo presnove, ki vsebuje ustrezno količino postmitohondrijske frakcije (v območju od 5 do 30 % v/v v zmesi za aktivacijo presnove), zmeša s poltrdim gojiščem (2,0 ml) skupaj z bakterijami in preizkušano snovjo/raztopino. Vsebina vsake epruvete se premeša in razlije po površini plošče minimalnega gojišča. Pred inkubacijo naj se poltrdo gojišče strdi.

Pri metodi poprejšnje inkubacije (2) (3) (5) (6) se preizkušana snov/raztopina inkubira skupaj s preizkusnim sevom (ki vsebuje približno 108 živih celic) in sterilnim pufrom ali sistemom za aktivacijo presnove (0,5 ml), navadno 20 minut ali več pri 30–37 °C, preden se zmeša s poltrdim gojiščem in razlije na površino plošče minimalnega gojišča. Navadno se 0,05 ali 0,1 ml preizkušane snovi/raztopine, 0,1 ml bakterij in 0,5 ml zmesi S9 ali sterilnega pufra zmeša z 2,0 ml poltrdega gojišča. Epruvete se med inkubacijo prezračujejo s stresalnikom.

Za ustrezno oceno nihanja naj se za vsako velikost odmerka uporabijo tri plošče. Uporaba dveh plošč je sprejemljiva, kadar je znanstveno utemeljena. Občasna izguba plošče ne pomeni nujno neveljavnega preizkusa.

Plinaste ali hlapne snovi naj se preizkušajo z ustreznimi metodami, na primer v zatesnjenih posodah (12) (14) (15) (16).

1.5.4 **Inkubacija**

Vse plošče posameznega preizkusa naj se inkubirajo 48-72 ur pri 37 °C. Po inkubaciji se določi število kolonij povratnih mutant na ploščo.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki se prikažejo kot število kolonij povratnih mutant na ploščo. Navede se tudi število kolonij povratnih mutant na ploščah negativne (kontrolni vzorec s topilom in neobdelani kontrolni vzorec, če se uporabi) in pozitivne kontrole. Navedejo se število na posameznih ploščah, srednja vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo in standardni odklon za preizkušano snov ter pozitivne in negativne (neobdelane in/ali s topilom) vzorce.

Preverjanje jasnega pozitivnega odziva ni potrebno. Dvoumni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih. Negativne rezultate je treba potrditi za vsak primer posebej. Kadar se pojmuje, da potrditev negativnih rezultatov ni potrebna, naj se to utemelji. V nadaljnjih poskusih naj se preuči možnost prilagoditve preizkusnih parametrov, da se razširi območje analiziranih pogojev. Preizkusni parametri, ki bi se lahko prilagodili, vključujejo intervale med koncentracijami, metodo obdelave (vključitev v ploščo ali poprejšnja inkubacija v suspenziji) in pogoje aktivacije presnove.

▼B

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor sta na primer s koncentracijo povezano povečanje v preizkušanem območju in/ali ponovljivo povečanje števila kolonij povratnih mutant na ploščo pri eni ali več koncentracijah pri vsaj enem sevu s sistemom za aktivacijo presnove ali brez njega (23). Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode (24). Vendar pa naj statistična značilnost ne bo edini odločilni dejavnik za pozitivni odziv.

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem preizkusu.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvoumni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultati preizkusa bakterijskih povratnih mutacij pomenijo, da snov povzroča točkovne mutacije z zamenjavo baz ali premikom bralnega okvira v genomu *Salmonella typhimurium* in/ali *Escherichia coli.* Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ni mutagena za preizkusno vrsto.

3. **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

— utemeljitev izbire topila/nosilca,

— topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Sevi:

— uporabljeni sevi,

— število celic na kulturo,

— značilnosti seva.

Preizkusni pogoji:

— količina preizkušane snovi na ploščo (mg/ploščo ali µl/ploščo), skupaj z razlogi za izbiro odmerka in števila plošč na koncentracijo,

— uporabljena gojišča,

— vrsta in sestava sistema za aktivacijo presnove, skupaj z merili sprejemljivosti,

— postopki obdelave.

Rezultati:

— znaki toksičnosti,

— znaki obarjanja,

— število kolonij na posameznih ploščah,

▼B

— srednja vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo in standardni odklon,

— odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,

— statistične analize, če so bile opravljene,

— podatki o sočasni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,

— podatki o pretekli negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. **LITERATURA**

(1) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, str. 347–364.

(2) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, str. 173–215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S., in Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, str. 217–233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K., in Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, str. 69–240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T., in Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, str. 91–96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., in Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, v: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, izd. Norpoth K. H., in Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, str. 273–285.

(7) Gatehouse, D. G, Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D., in Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, v: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS, del 1, pregledan, izd. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, str. 13–61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U., in Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, str. 167–177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J., in Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutation Res., 38, str. 33–42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D., in Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, v: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2. izdaja, izd. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., in Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, str. 141–161.

▼B

(11) Thompson, E. D., in Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis, 3, str. 453–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F., in Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, str. 335–344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D., in Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, str. 33–47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T., in Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 19, str. 2–141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K., in Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges in F., Sobels (izd.) Elsevier, Amsterdam, str. 249–258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G., in Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, str. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., in Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium,* Cancer Res., 39, str. 3780–3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A., in Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, str. 4961–4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J., in Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, str. 285–291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, v: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, izd. F. J. de Serres idr. Elsevier, North Holland, str. 85–88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, str. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J., in Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, str. 343–350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., in Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, str. 83–91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D., in Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, v: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, del II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, izd. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, str. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17 *IN VITRO* PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENOV HPRT IN XPRT

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 476 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in dobrobiti živali. V tej revidirani različici preskusne metode B.17 se upoštevajo skoraj tridesetletne izkušnje s tem preskusom, pa tudi rezultati razvijanja ločene nove metode za *in vitro* preskuse genskih mutacij v celicah sesalcev z uporabo gena za timidin kinazo. Preskusna metoda B.17 je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).

2. Namen *in vitro* preskusa genskih mutacij v celicah sesalcev je zaznati genske mutacije, katerih nastanek povzročajo kemikalije. S celičnimi linijami, uporabljenimi pri teh preskusih, se merijo napredne mutacije na poročevalskih genih, natančneje endogenem genu za hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (Hprt v celicah glodavcev, HPRT v človeških celicah; pri tej preskusni metodi v nadaljnjem besedilu skupaj: gen Hprt in preskus HPRT) in transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (gpt) (v nadaljnjem besedilu: preskus XPRT). S preskusi mutacij HPRT in XPRT se zaznajo različne vrste genskih pojavov. Poleg mutacijskih pojavov, zaznanih s preskusom HPRT (npr. substitucije baznih parov, premiki bralnega okvira, majhne delecije in insercije), lahko lokacija transgena gpt na avtosomih omogoči zaznavo mutacij, ki so posledica obsežnih delecij, in morebitne mitotične rekombinacije, ki se ne zazna s preskusom HPRT, ker je gen Hprt na kromosomu X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Preskus XPRT se za regulativne namene trenutno uporablja manj pogosto kot preskus HPRT.

3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

4. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti.

5. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi vodili do lažno pozitivnih rezultatov (tj. morebitnemu medsebojnemu delovanju s preskusnim sistemom), ki jih ne bi povzročilo neposredno medsebojno delovanje preskusnih kemikalij in genetskega materiala celice; med take pogoje spadajo spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (8) (9) (10), medsebojno delovanje s sestavinami gojišča (11) (12) ali previsoke ravni citotoksičnosti (13). Za citotoksičnost, ki presega priporočene najvišje ravni citotoksičnosti, kot so opredeljene v odstavku 19, se šteje, da je prevelika za preskus HPRT.

▼M8

6. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSA

7. Mutirane celice brez aktivnosti encima Hprt pri preskusu HPRT ali aktivnosti encima xprt pri preskusu XPRT so odporne proti citostatskim učinkom analoga purina 6-tiogvanina (TG). Celice s Hprt (pri preskusu HPRT) ali gpt (pri preskusu XPRT) so občutljive za TG, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TG, medtem ko normalne celice, ki vsebujejo encim Hprt (pri preskusu HPRT) ali gpt (pri preskusu XPRT), niso.

8. Celice v suspenziji ali enoplastni kulturi se za ustrezno obdobje (3–6 ur) izpostavijo preskusni kemikaliji, in sicer z zunanjim virom presnovne aktivacije (glej odstavek 14) in brez njega, nato pa se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant (14) (15) (16) (17). Citotoksičnost se določi glede na relativno preživetje, tj. učinkovitost tvorbe klonov, izmerjeno takoj po tretiranju in prilagojeno glede na morebitno izgubo celic med tretiranjem v primerjavi z negativno kontrolo (odstavek 18 in Dodatek 2). Tretirane kulture se vzdržujejo v gojišču dovolj dolgo obdobje, ki je značilno za vsako vrsto celic, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij (običajno najmanj 7–9 dni). Po izražanju fenotipa se pogostnost mutant določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane kolonije, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (viabilnost). Po ustrezno dolgi inkubaciji se preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant.

OPIS METODE

Pripravki

Celice

9. Vrste celic, uporabljene pri preskusih HPRT in XPRT, morajo imeti dokazano občutljivost za kemične mutagene, veliko učinkovitost tvorbe klonov, stabilen kariotip in stabilno pogostnost spontanih mutant. Med najpogosteje uporabljenimi celicami za preskus HPRT so linije celic kitajskega hrčka CHO, CHL in V79, celice limfoma miši L5178Y in človeške limfoblastoidne celice TK6 (18) (19). Pri preskusu XPRT se uporabljajo celice AS52, pridobljene iz CHO, ki vsebujejo transgen gpt (in v katerih je izbrisan gen Hprt) (20) (21); preskusa HPRT ni mogoče izvesti s celicami AS52, ker je bil gen hprt izbrisan. Uporaba drugih celičnih linij mora biti utemeljena in validirana.

10. Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo (22) (23); celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla,

▼M8

uporabljenega v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic. Preveriti je treba tudi pogostnost spontanih mutant v zalogi matičnih celic, pri čemer se zaloga ne sme uporabiti, če pogostnost mutant ni sprejemljiva.

11. Pred uporabo pri tem preskusu je iz kultur morda treba odstraniti že obstoječe mutirane celice, npr. z gojenjem v gojišču HAT za preskus HPRT in MPA za preskus XPRT (5) (24) (glej Dodatek 1). Očiščene celice se lahko shranijo z zamrzovanjem in nato odtalijo, da se uporabijo kot delovne zaloge. Novoodtaljena delovna zaloga se lahko uporabi za preskus, ko so doseženi običajni podvojitveni časi. Pri izvajanju preskusa XPRT je treba pri rutinskem gojenju celic AS52 uporabiti pogoje, ki zagotavljajo vzdrževanje transgena gpt (20).

Gojišča in pogoji kultiviranja

12. Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO2 in temperatura inkubacije 37 °C). Celične kulture je treba vedno vzdrževati v pogojih, ki zagotavljajo njihovo rast v logaritemski fazi. Posebno pomembno je, da se izberejo takšna gojišča in pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v času izražanja in optimalno učinkovitost tvorbe klonov mutiranih, pa tudi nemutiranih celic.

Priprava kultur

13. Celične linije se namnožijo iz osnovnih kultur ter nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju med obdobji tretiranja in izražanja še naprej eksponentno rastejo (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

Presnovna aktivacija

14. Pri uporabi celic, ki nimajo ustrezne notranje sposobnosti presnavljanja, je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), ali z mešanico fenobarbitala in β-naftoflavona (29) (30) (31) (32). Zadnjenavedena mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (33) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (29) (31). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Na izbiro vrste in koncentracije zunanjega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred snovi, ki se preskušajo (34) (35) (36).

Priprava preskusne kemikalije

15. Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in razredčiti, če je to ustrezno (glej odstavek 16). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (37) (38). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

▼M8

PRESKUSNI POGOJI

Topila

16. Izbrati je treba tako topilo, ki optimira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rasti celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila v končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če uporabljena topila niso uveljavljena (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter neobstoj genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba dodati netretirane kontrole (glej Dodatek 1), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

Merjenje citotoksičnosti in izbiranje koncentracij izpostavljenosti

17. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 20), obarjanje v gojiščih (glej odstavek 21) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 5). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufra v končno obdelovalno gojišče, da se preprečijo lažno pozitivni rezultati in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

18. Izbira koncentracije temelji na citotoksičnosti in drugih preudarkih (glej odstavke 20–22). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Tudi če se izvede začetna ocena citotoksičnosti, je treba pri glavnem preskusu še vedno izmeriti citotoksičnost vsake kulture. Oceniti jo je treba na podlagi relativnega preživetja, tj. učinkovitosti tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeni z morebitno izgubo celic med tretiranjem na podlagi štetja celic, v primerjavi s prilagojeno učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje) (za formulo glej Dodatek 2).

19. Oceniti je treba vsaj štiri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji uporabi ponovljeni vzorec kulture ali le ena sama tretirana kultura. Rezultate, pridobljene pri neodvisnih ponovljenih vzorcih kultur za zadevno koncentracijo, je treba navesti ločeno, vendar se lahko za podatkovno analizo združijo (17). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, so ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje od koncentracije, ki povzroča citotoksičnosti, do koncentracij, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je za zajem celotnega območja citotoksičnosti

▼M8

ali podrobno preučitev razmerja med koncentracijo in odzivom morda treba uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in več kot štiri koncentracije, zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 43). Uporaba več kot štirih koncentracij je lahko še zlasti pomembna, če se uporabi ena sama kultura.

20. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati za od 20- do 10-odstotno relativno preživetje. Pazljivost je potrebna pri razlagi pozitivnih rezultatov, dobljenih samo pri 10-odstotnem ali manjšem relativnem preživetju (odstavek 43).

21. Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa. Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.

22. Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 μl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (39) (40). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (tj. kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo (UVCB)) (41), okoljski ekstrakti itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (42).

Kontrole

23. Za vsak preskusni pogoj je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 16), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču in obdelane enako kot kulture za tretiranje.

24. Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokažeta zmožnost laboratorija, da odkrije mutagene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, in učinkovitost zunanjega sistema presnovne aktivacije, če je ustrezno. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge snovi, če je to utemeljeno. Ker so *in vitro* preskusi genotoksičnosti za celice sesalcev dovolj standardizirani, se lahko preskusi, pri katerih se uporablja tretiranje z zunanjim sistemom presnovne aktivacije in brez njega, izvedejo tudi samo s pozitivno kontrolo, pri kateri je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema, odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi presegla meje, določene za to preskusno metodo (glej odstavek 20).

▼M8

Preglednica 1

Referenčne snovi, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Stanje presnovne aktivacije	Lokus	Snov in št. CAS
Ni zunanje presnovne aktivacije	*Hprt*	Etilmetansulfonat [št. CAS 62-50-0] Etilnitrozourea [št. CAS 759-73-9] 4-nitrokvinolin 1-oksid [št. CAS 56-57-5]
	xprt	Streptonigrin [št. CAS 3930-19-6] Mitomicin C [št. CAS 50-07-7]
Zunanja presnovna aktivacija	*Hprt*	3-metilkolantren [št. CAS 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [št. CAS 57-97-6] Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]

POSTOPEK

Tretiranje s preskusno kemikalijo

25. Množeče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije. Čas izpostavljenosti naj bo ustrezno dolg (navadno je ustrezno 3–6 ur).

26. Najmanjše število celic, ki se za vsako preskusno kulturo (kontrolno in tretirano) uporabijo v vsaki fazi preskusa, mora temeljiti na pogostnosti spontanih mutant. Splošno vodilo je, da se tretira in pasažira dovolj celic, da se v vseh fazah preskusa v vsaki kulturi vzdržuje 10 spontanih mutant (17). Pogostnost spontanih mutant običajno znaša med 5 in 20 × 10-6. Za pogostnost spontanih mutant 5 × 10-6 in vzdrževanje zadostnega števila spontanih mutant (10 ali več) tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost med tretiranjem (10-odstotno relativno preživetje), bi bilo treba tretirati vsaj 20 × 10-6 celic. Poleg tega je treba v obdobju izražanja kultivirati in nasaditi na ploščo zadostno število celic (vendar nikoli manj kot 2 milijona) za selekcijo mutant (17).

Čas izražanja fenotipa in merjenje pogostnosti mutant

27. Po obdobju tretiranja se celice kultivirajo, da se omogoči izražanje fenotipa mutant. Najmanj 7–9 dni običajno zadostuje za skoraj optimalno izražanje fenotipa na novo induciranih mutant Hprt in xprt (43) (44). V tem obdobju se celice redno kultivirajo v novem gojišču, da se vzdržujejo v fazi eksponentne rasti. Po izražanju fenotipa se celice znova nasadijo v gojišče s selektivno snovjo (6-tiogvanin) in gojišče brez take snovi, da se določita število mutant oziroma učinkovitost tvorbe klonov ob selekciji. Za to nasaditev se lahko uporabijo posode za monoslojne kulture ali mikrotitrske plošče za celice v suspenziji. Za selekcijo mutant je treba celice nasaditi tako na gosto, da se zagotovi optimalna pridobitev mutant (tj. da se prepreči metabolično sodelovanje) (17). Plošče se inkubirajo primerno dolgo za optimalno rast kolonije (npr. 7–12 dni), kolonije pa se preštejejo. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant (za formule glej Dodatek 2).

▼M8

Usposobljenost laboratorija

28. Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi snovmi, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj ena aktivna s presnovno aktivacijo in ena aktivna brez nje, pri čemer sta snovi izbrani med snovmi s seznama v preglednici 1) in različnimi negativnimi kontrolami (z uporabo različnih topil/vehiklov), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih od 30 do 33.

29. Izbor snovi za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1 v odstavku 25) je treba preiskati brez presnovne aktivacije in ob presnovni aktivaciji, da se dokažejo usposobljenost za zaznavanje mutagenih kemikalij in določanje učinkovitosti sistema presnovne aktivacije, ustreznost pogojev za rast celic med tretiranjem, izražanjem fenotipa in selekcijo mutant ter ustreznost postopkov štetja. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemikalij, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

30. Laboratorij mora določiti:

— območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter

— območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

31. Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah (22). Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo presegati 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (17) (45) (46).

32. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali karte „X-črta“ (47)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, ter pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (46). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (45).

33. V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pogostnost mutant iz ene kulture ali po možnosti ponovljenih vzorcev kulture, kot je opisano v odstavku 23. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo presegati 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (17) (45) (46). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej zgoraj), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

▼M8

34. Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba preučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

35. V predstavitev rezultatov je treba vključiti vse podatke, potrebne za izračun citotoksičnosti (izražene kot relativno preživetje). Podatki za tretirane in kontrolne kulture morajo vključevati število celic ob koncu tretiranja, število celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, in število kolonij (ali število jamic brez kolonij pri metodi z mikrotitrsko ploščo). Relativno preživetje za vsako kulturo je treba izraziti kot delež glede na hkratno kontrolo s topilom (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1).

36. V predstavitev rezultatov je treba vključiti tudi vse podatke, potrebne za izračun pogostnosti mutant. Podatki za tretirane in kontrolne kulture morajo vključevati: (1) število celic, nasajenih na ploščo s selektivno snovjo in brez take snovi (ob nasaditvi celic na ploščo za selekcijo mutant), ter (2) število preštetih kolonij (ali število jamic brez kolonij pri metodi z mikrotitrsko ploščo) na ploščah s selektivno snovjo in brez take snovi. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij (na ploščah s selektivno snovjo), korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov (s plošč brez selektivne snovi). Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na milijon viabilnih celic (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1).

37. Navesti je treba podatke za posamezne kulture. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice.

Merila za sprejemljivost

38. Sprejemljivost preskusa temelji na merilih, navedenih v nadaljevanju.

— Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 33.

— Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 24) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.

— Preskušena sta bila dva preskusna pogoja (tj. s presnovno aktivacijo in brez nje), razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (glej odstavek 25).

— Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavki 25, 26 in 19).

— Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 20, 21 in 22.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

39. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev:

▼M8

— pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

— pojavijo rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 33).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek genskih mutacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (46) (48).

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev:

— pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

— vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 33).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti nastanka genskih mutacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu.

41. Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

42. Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9)).

43. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih. Zato je treba zaključiti, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen (kar pomeni, da je enako verjetno pozitiven ali negativen).

Poročilo o preskusu

44. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

▼**M8**

— Snov iz ene sestavine

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila;

— delež topila v končnem gojišču.

Celice:

za laboratorijske izvorne kulture:

— vrsta, izvor celičnih linij;

— število pasaž, če je na voljo, in pretekli rezultati v laboratoriju;

— lastnosti kariotipa in/ali modalno število kromosomov;

— metode vzdrževanja celičnih kultur;

— odsotnost mikoplazem;

— podvojitveni čas celic.

Preskusni pogoji:

— razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejami topnosti;

— sestava gojišča, koncentracija CO_2, stopnja vlažnosti;

— koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v μg ali mg/ml ali mM gojišča);

— koncentracija (in/ali količina) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;

— temperatura inkubacije;

— čas inkubacije;

— trajanje tretiranja;

— gostota celic med tretiranjem;

— vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali količina zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9); snovi pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;

— dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno);

▼**M8**

— identiteta selektivne snovi in njena koncentracija;

— merila za sprejemljivost preskusov;

— uporabljene metode za določanje števila viabilnih in mutiranih celic;

— uporabljene metode za merjenje citotoksičnosti;

— vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;

— trajanje inkubacije po nasaditvi na ploščo;

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;

— uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

Rezultati:

— število tretiranih celic in število celic, kultiviranih na novem gojišču, za vsako kulturo;

— meritve citotoksičnosti in morebitna druga opažanja;

— znaki obarjanja in čas odkritja;

— število celic, nasajenih v selektivno in neselektivno gojišče;

— število kolonij v neselektivnem gojišču in število odpornih kolonij v selektivnem gojišču ter s tem povezani pogostnosti mutant;

— razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

— podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);

— podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, razponi, srednje vrednosti in standardni odkloni ter interval zaupanja (npr. 95 %), pa tudi število podatkov;

— statistične analize (za posamezne kulture in združene ponovljene vzorce, če je ustrezno) in p-vrednosti, če obstajajo.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J., in Tindall, K. R. (ur.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

▼**M8**

(3) Chu, E. H. Y., in Malling, H. V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., ZDA, 61, 1306–1312.

(4) Moore, M. M., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L., in Dearfield, K. L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394–403.

(5) Aaron, C. S., in Stankowski, L. F., Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121–128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J., in Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H., in Wasson, J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17–36.

(8) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., in Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147–204.

(9) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., in Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789–886.

(11) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., in Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439–452.

(12) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., in Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177–183.

(13) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., in Müller, L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F., Jr., in Yang, L. L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski, L. F., Jr., Tindall, K. R., in Hsie, A. W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., in Asquith, J. C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J. (ur.). CambridgeUniversity Press, str. 66–101.

(18) Hsie, A. W., Casciano, D. A., Couch, D. B., Krahn, D. F., O'Neill, J. P., in Whitfield, B. L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193–214.

(19) Li, A. P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165–175.

(20) Tindall, K. R., Stankowski, L. F., Jr., Machanoff, R., in Hsie, A. W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411–1415.

(21) Hsie, A. W., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M., in Schenley, R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., Donovan, M. O., Honma, M., Kohara, A., Van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., in Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rokopis v pripravi).

(23) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., in Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261–287.

(24) Rosen, M. P., San, R. H. C., in Stich, H. F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299–305.

(25) Natarajan, A. T., Tates, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M., in de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N., in Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. V: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. De Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., in Philpot, R. M. (ur.). Elsevier, North-Holland, str. 85–88.

▼**M8**

(31) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C. R., in Zeiger, E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55–65.

(32) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R., in Galloway, S. M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51–59.

(33) UNEP. (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP). Na voljo na: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan, E.-L., in Hsie, A. W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill, J. P., Machanoff, R., San Sebastian, J. R., in Hsie, A. W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7–18.

(36) Li, A. P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. V: Tice, R. R., Costa, D. L., in Schaich, K. M. (ur.). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, str. 91–103.

(38) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795–801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (smernice za preskušanje 473, 476 in 487). Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj.

(40) Brookmire, L., Chen, J. J., in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Na voljo na: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill, J. P., in Hsie, A. W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109–118.

(44) Chiewchanwit, T., Ma, H., El Zein, R., Hallberg, L., in Au, W. W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121–8.

▼**M8**

(45) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87–90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 199), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(47) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O., in Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (ur.). Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.

(48) Fleiss, J. L., Levin, B., in Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3. izdaja, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Mutageni substitucije baznih parov: kemikalije, ki povzročijo zamenjavo baznih parov v DNK.

Kemikalija: snov ali zmes.

Učinkovitost tvorbe klonov: delež celic, nasajenih na ploščo pri nizki gostoti in sposobnih zrasti v kolonijo, ki jo je mogoče prešteti.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v to preskusno metodo, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativnega preživetja tretiranih celic v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej zadevni odstavek).

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja ali funkcije kodiranega proteina.

Mutageni premika bralnega okvira: kemikalije, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNK.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNK ali kromosomov, vključno s prelomi DNK, prerazporeditvijo aduktov, mutacijami, aberacijami kromosomov in anevploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajnih kromosomskih poškodb.

Gojišče HAT: gojišče, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin ter se uporablja za čiščenje mutant Hprt.

Mitotična rekombinacija: med mitozo rekombinacija med homolognimi kromatidi, ki lahko povzroči indukcijo prelomov dvojne vijačnice DNK ali izgubo heterozigotnosti.

Gojišče MPA: gojišče, ki vsebuje ksantin, adenin, timidin, aminopterin in mikofenolno kislino ter se uporablja za čiščenje mutant Xprt.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih kolonij, deljeno s številom celic, nasajenih na ploščah v selektivnem gojišču, korigirano z učinkovitostjo tvorbe klonov (ali viabilnostjo) ob selekciji.

Čas izražanja fenotipa: čas po tretiranju, v katerem je gensko spreminjanje fiksirano znotraj genoma, vsi morebitni predhodno obstoječi genski produkti pa so odstranjeni, tako da se spremeni fenotipska lastnost.

Relativno preživetje: relativno preživetje se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem. Pomeni učinkovitost tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje).

Frakcije S9, pripravljene iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

▼**M8**

Mešanica S9: mešanica frakcije S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirana kontrola: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno obdelujejo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

▼M8

Dodatek 2

FORMULE ZA OCENO CITOTOKSIČNOSTI IN POGOSTNOSTI MUTANT

Citotoksičnost se oceni z relativnim preživetjem, tj. učinkovitostjo tvorbe klonov (CE) celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi s prilagojeno učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje) (glej formulo za relativno preživetje (RS) v nadaljevanju).

Prilagojena učinkovitost tvorbe klonov za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$\text{prilagojena CE} = \frac{\text{število celic na koncu tretiranja}}{\text{število celic na začetku tretiranja}}$$

Relativno preživetje za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$\text{RS} = \frac{\text{prilagojena CE za tretirano kulturo}}{\text{prilagojena CE za kontrolo s topilom}} \times 100$$

Pogostnost mutant je učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču, deljena z učinkovitostjo tvorbe klonov v neselektivnem gojišču, ob selekciji izmerjeno za isto kulturo.

$$\text{pogostnost mutant} = \frac{\text{učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču}}{\text{učinkovitost tvorbe klonov v neselektivnem gojišču}}$$

Kadar se za učinkovitost tvorbe klonov uporabljajo plošče:

učinkovitost tvorbe klonov = število kolonij/število celic, nasajenih na ploščo.

Kadar se za učinkovitost tvorbe klonov uporabljajo mikrotitrske plošče:

število kolonij na vsako jamico na mikrotitrskih ploščah sledi Poissonovi porazdelitvi.

Učinkovitost tvorbe klonov = –LnP(0)/število celic, nasajenih na ploščo, na jamico

Kjer je –LnP(0) verjetno število praznih jamic med nasajenimi celicami, opisano z naslednjo formulo

LnP(0) = –Ln (število praznih jamic/število nasajenih jamic)

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21 **PRESKUSI CELIČNE TRANSFORMACIJE SESALSKIH CELIC *IN VITRO***

1. **METODA**

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Za odkrivanje fenotipskih sprememb *in vitro,* ki jih inducirajo kemijske snovi, povezane z maligno transformacijo *in vivo,* se lahko uporabijo sistemi sesalskih celičnih kultur. Med splošno uporabljane celice spadajo C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE in podgane Fischer, preskusi pa temeljijo na spremembah v celični morfologiji, oblikovanju žarišč ali spremembah na izgubi pritrjevalne odvisnosti celic v poltrdnem agarju. Obstajajo tudi redkeje uporabljani sistemi, ki odkrivajo fiziološke ali morfološke spremembe v celicah po izpostavljenosti rakotvornim kemikalijam. Niti eden od ciljnih učinkov preskusa *in vitro* nima določene mehanistične povezave z rakom. Nekateri preskusni sistemi lahko odkrijejo promotorje tumorjev. Citotoksičnost se lahko določi z merjenjem učinka preskusnega materiala na sposobnosti tvorbe kolonij (učinkovitost kloniranja) ali na stopnje rasti kultur. Namen merjenja citotoksičosti je ugotoviti, ali je bila izpostavljenost preskusni kemikaliji toksikološko relevantna, ni pa mogoče z njim izračunati frekvenco transformacije v vseh preskusih, saj lahko nekateri vsebujejo podaljšano inkubacijo in/ali ponovni razmaz na plošče.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Priprave

Celice

Odvisno od uporabljanega preskusa transformacije je na voljo niz celičnih linij ali primarnih celic. Raziskovalec mora zagotoviti, da celice v opravljanem preskusu kažejo ustrezno fenotipsko spremembo po izpostavljenosti znanim rakotvornim snovem in da sta veljavnost in zanesljivost preskusa, ki se ga opravlja v raziskovalčevem laboratoriju, dokazljivi in dokumentirani.

Gojišče

Uporabiti je treba gojišča in preskusne pogoje, ki ustrezajo izvajanemu preskusu transformacije.

▼B

Preskusna snov

Preskusne snovi se lahko pripravijo v gojišču ali raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih tik pred tretiranjem celic. Končna koncentracija nosilca v gojitvenem sistemu ne sme vplivati na sposobnost preživetja celic, stopnjo rasti ali pojav transformacije.

Metabolna aktivacija

Celice je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema. Kadar pa so uporabljeni tipi celic z endogeno metabolno aktivacijo, se je treba prepričati, da narava aktivnosti ustreza kemijskemu razredu, ki se preskuša.

Preskusni pogoji

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

V vsak preskus je treba vključiti pozitivne kontrole z uporabo neposredno delujoče spojine ter spojine, ki zahteva metabolno aktivacijo; uporabiti je treba tudi negativno kontrolo (nosilec).

Primeri snovi, ki jih je mogoče uporabiti kot pozitivne kontrole, so naslednji:

— Neposredno delujoče kemikalije:

  — etilmetansulfonat,

  — β-propiolakton.

— Spojine, ki zahtevajo aktivacijo presnove:

  — 2-acetilaminofluoren,

  — 4-dimetil aminoazobenzen,

  — 7,12-dimetilbenzantracen.

Kadar je primerno, je treba vključiti dodatno pozitivno kontrolno enakega kemijskega razreda, kot je preskušana spojina.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba nekaj koncentracij preskusne snovi. Te koncentracije morajo povzročiti s koncentracijo povezane učinke strupenosti, pri čemer najvišja koncentracija povzroča nizko stopnjo preživetja, preživetje v najnižji koncentraciji pa mora biti približno enako kot v negativni kontroli. Snovi, relativno netopne v vodi, je treba preskušati do meje njihove topnosti z uporabo ustreznih postopkov. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo preskusne snovi določiti od primera do primera.

▼B

Postopek

Celice je treba izpostaviti za ustrezno obdobje, odvisno od uporabljenega preskusnega sistema, to pa lahko pri podaljšani izpostavljenosti vključuje ponovno dajanje odmerka ob spremembi gojišča (in, če je potrebno, sveže mešanice za metabolno aktivacijo). Celice, ki nimajo zadostne endogene metabolne aktivacije, je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema. Na koncu obdobja izpostavljenosti se s celic spere preskusna snov in celice se gojijo v pogojih, ki ustrezajo spremljanemu transformiranega fenotipa ter pojavnosti nekatere transformacije. Vsi rezultati se potrdijo v neodvisnem preskusu.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, ti pa so lahko zelo različni, odvisno od uporabljenega preskusa, npr. število kolonij ali žarišč na ploščo, pozitivne plošče ali število transformiranih celic. Kadar je primerno, je treba preživetje izraziti kot odstotek kontrolne stopnje in frekvence transformacij izražene s številom transformantov na število preživelih celic. Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljen tip celic, število celičnih kultur, metode vzdrževanja celičnih kultur,

— preskusni pogoji: koncentracija preskusne snovi, uporabljen nosilec, inkubacijski čas, trajanje in frekvenca tretiranja, gostota celic v času tretiranja, tip uporabljenega eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema, pozitivne in negativne kontrole, določitev spremljanega fenotipa, uporabljen selektivni sistem (če je primerno), utemeljitev izbora odmerka,

— metoda preštevanja živih in transformiranih celic,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 OCENA IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

▼M8

B.22 **PRESKUS DOMINANTNE SMRTNOSTI NA GLODAVCIH**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 478 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in preudarkov v zvezi z dobrobitjo živali. Pri tej spremenjeni različici preskusne metode se upoštevajo več kot tridesetletne izkušnje s tem preskusom ter možnosti za združevanje ali kombiniranje tega preskusa z drugimi preskusi toksičnosti, kot sta razvojna in reproduktivna toksičnost, ali študijami genotoksičnosti; vendar ta preskus zaradi svojih omejitev in uporabe velikega števila živali ni namenjen temu, da bi se uporabljal kot glavna metoda, temveč kot dopolnilna preskusna metoda, ki se lahko uporabi samo, kadar ni druge možnosti glede na regulativne zahteve. S kombiniranjem preskušanja toksičnosti bi bilo mogoče velikemu številu živali prizanesti z uporabo v preskusih toksičnosti. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).

2. Namen preskusa dominantne smrtnosti je raziskati, ali kemikalije povzročajo mutacije, ki so posledica kromosomskih aberacij v zarodnih celicah. Poleg tega je preskus dominantne smrtnosti primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivu, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Indukcija dominantne smrtne mutacije po izpostavljenosti preskusni kemikaliji kaže, da kemikalija deluje na zarodno tkivo preskusne živali.

3. Dominantne smrtne mutacije povzročajo embrionalno ali fetalno smrt. Indukcija dominantne smrtne mutacije po izpostavljenosti preskusni kemikaliji kaže, da je kemikalija vplivala na zarodne celice preskusne živali.

4. Poskus dominantne smrtnosti je koristen za potrditev pozitivnih rezultatov preskusov s somatskimi končnimi točkami *in vivo* ter je ustrezna končna točka za napoved nevarnosti za ljudi in tveganje genskih bolezni, ki se prenašajo prek zarodne linije. Vendar je za ta preskus potrebnih veliko živali in je delovno intenziven; posledično je njegova izvedba zelo draga in zamudna. Ker je spontana pogostnost dominantnih smrtnih mutacij precej visoka, je občutljivost preskusa za zaznavo majhnih povečanj pogostnosti mutacij na splošno omejena.

5. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

6. Preskus se najpogosteje izvaja na miših (2) (3) (4), vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, kot so podgane (5) (6) (7) (8), če je to znanstveno utemeljeno. Dominantne smrtnosti so običajno posledica velikih kromosomskih aberacij (strukturne in numerične anomalije) (9) (10) (11), vendar genskih mutacij ni mogoče izključiti. Dominantna smrtna

▼M8

mutacija je mutacija, ki nastane v sami zarodni celici ali se po oploditvi fiksira v zgodnjem zarodku in ne povzroči nepravilnega delovanja gamete, vendar je smrtonosna za oplojeno jajčece ali razvijajoči se zarodek.

7. Posamezni samci se v ustreznih časovnih presledkih zaporedno parijo s samicami, ki se še niso parile. Število parjenj po tretiranju je odvisno od glavnega namena študije dominantne smrtnosti (odstavek 23) in mora zagotavljati, da se za dominantne smrtnosti ocenijo vse faze zorenja moške zarodne celice (12).

8. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali njeni metaboliti ne bodo dosegli moda, ta preskus ni primeren.

NAČELO PRESKUSA

9. Na splošno se samci izpostavijo preskusni kemikaliji z ustreznim načinom izpostavljenosti in parijo z netretiranimi samicami, ki se še niso parile. Z zaporednimi intervali parjenja se lahko preskušajo različne vrste zarodnih celic. Po parjenju se samice po ustreznem času evtanazirajo, njihove maternice pa se pregledajo, da se določi število ugnezditev ter živih in mrtvih zarodkov. Dominantna smrtnost preskusne kemikalije se določi s primerjavo živih ugnezditev na samico v tretirani skupini z živimi ugnezditvami na samico v kontrolni skupini z vehiklom/topilom. Porast števila mrtvih ugnezditev na samico v tretirani skupini nad število mrtvih ugnezditev na samico v kontrolni skupini kaže na izgubo po ugnezditvi, povzročeno s preskusno kemikalijo. Izguba po ugnezditvi se izračuna z določitvijo razmerja med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v tretirani skupini v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v kontrolni skupini. Izguba pred ugnezditvijo se lahko oceni s primerjavo števila rumenih telesc, od katerega se odšteje skupno število ugnezditev, ali skupnega števila ugnezditev na samico v tretirani in kontrolni skupini.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Usposobljenost za ta poskus je treba dokazati tako, da se pokaže sposobnost za ponovitev pogostnosti dominantne smrtnosti iz objavljenih podatkov (npr. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) s snovmi za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi), kot so tiste iz preglednice 1, in kontrolami z vehiklom, pri čemer se dobijo pogostnosti iz negativnih kontrol, ki so v skladu s sprejemljivim razponom podatkov (glej vire zgoraj) ali s porazdelitvijo kontrol iz preteklih preskusov laboratorija, če je na voljo.

OPIS METODE

Pripravki

Izbira živalskih vrst

11. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve zdravih spolno zrelih živali. Običajno se uporabljajo miši, primerne pa so lahko tudi podgane. Uporabi se lahko katera koli druga ustrezna vrsta sesalcev, če je to v poročilu znanstveno utemeljeno.

▼M8

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

12. Pri glodavcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Pred tretiranjem ali parjenjem je treba glodavce nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol, če agresivno vedenje ni pričakovano ali opaženo, in tretirano skupino, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

13. Zdravi in spolno zreli odrasli samci in samice se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa in prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

Priprava odmerkov

14. Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Preskusni pogoji

Topilo/vehikel

15. Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme zbujati suma, da lahko kemično reagira s preskusno kemikalijo. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje in koruzno olje.

Pozitivne kontrole

16. Vedno je treba uporabiti živali za sočasne pozitivne kontrole, razen če je laboratorij dokazal usposobljenost za izvedbo preskusa in je v zadnjem času preskus redno uporabljal (npr. v zadnjih petih letih). Vendar živali za pozitivne kontrole ni treba tretirati enako kot živali, ki prejmejo preskusno

▼M8

kemikalijo, niti ni treba vzorčiti vseh intervalov parjenja. Za snovi za pozitivno kontrolo mora biti znano, da povzročajo dominantne smrtnosti v pogojih, uporabljenih pri preskusu. Z živalmi v kontrolnih skupinah je treba ravnati enako kot z živalmi v tretiranih skupinah, le da se ne tretirajo.

17. Odmerki snovi za pozitivno kontrolo morajo biti izbrani tako, da povzročajo blage ali zmerne učinke, ki kritično ocenijo uspešnost in občutljivost preskusa, vendar dosledno povzročajo pozitivne učinke dominantne smrtnosti. Primeri snovi za pozitivno kontrolo in ustrezni odmerki so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1

Primeri snovi za pozitivno kontrolo

SNOV [št. CAS] (referenčna št.)	Razpon efektivne doze (mg/kg) (vrsta glodavcev)	Čas dajanja (v dnevih)
Trietilenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (miši)	1
Ciklofosfamid [50-18-0] (19)	50–150 (miši)	5
Ciklofosfamid [50-18-0] (5)	25–100 (podgane)	1
Etil metansulfonat [62-50-0] (13)	100-300 (miši)	5
Monomerni akrilamid [79-06-1] (17)	50 (miši)	5
Klorambucil [305-03-3] (14)	25 (miši)	1

Negativne kontrole

18. Živali za negativno kontrolo, tretirane samo s topilom ali vehiklom, sicer pa tretirane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti za vsak čas vzorčenja (20). Če ni kontrolnih podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano topilo/vehikel ne povzroča dominantnih smrtnosti ali drugih škodljivih učinkov, je treba za vsak čas vzorčenja vključiti tudi netretirane kontrolne živali, da se dokaže sprejemljivost kontrol z vehiklom.

POSTOPEK

Število živali

19. Posamezni samci se parijo v ustreznih vnaprej določenih intervalih (npr. tedenskih, odstavka 21 in 23), po možnosti z eno samico, ki se še ni parila. Število samcev na skupino je treba določiti vnaprej, da zadostuje (v povezavi s številom sparjenih samic pri vsakem intervalu parjenja) za zagotovitev statistične moči, potrebne za zaznavo vsaj podvojitve pogostnosti dominantne smrtnosti (odstavek 44).

20. Tudi število samic na interval parjenja je treba določiti vnaprej z izračuni statistične moči, da se omogoči zaznava vsaj podvojitve pogostnosti dominantne smrtnosti (tj. dovolj brejih samic, da se zagotovi vsaj 400 vseh ugnezditev) (20) (21) (22) (23) in da se pričakuje vsaj ena mrtva ugnezditev na enoto analize (tj. paritvena skupina na odmerek) (24).

▼M8

Obdobje dajanja odmerkov in intervali parjenja

21. Število intervalov parjenja po tretiranju je določeno s časovnim razporedom tretiranja in mora zagotavljati, da se v vseh fazah zorenja moške zarodne celice oceni indukcija dominantne smrtnosti (12) (25). Pri enkratnem tretiranju z dajanjem največ petih dnevnih odmerkov je treba po zadnjem tretiranju v tedenskih intervalih izvesti osem (pri miših) ali deset (pri podganah) parjenj. Pri dajanju večkratnih odmerkov se lahko število intervalov parjenja zmanjša sorazmerno s podaljšanjem obdobja dajanja, pri čemer je treba ohraniti cilj, da se ocenijo vse faze spermatogeneze (npr. po 28-dnevni izpostavljenosti zadostujejo samo štiri tedenska parjenja, da se ocenijo vse faze spermatogeneze pri miših). Vsi časovni razporedi tretiranj in parjenj morajo biti znanstveno utemeljeni.

22. Samice morajo ostati pri samcih vsaj v času enega pojatvenega ciklusa (npr. en teden zajema en pojatveni ciklus pri miših in podganah). Samice, ki se med enotedenskim intervalom niso parile, se lahko uporabijo za naslednji interval parjenja. Ali dokler se ne zgodi parjenje, kar se ugotovi ob prisotnosti semenčic v vagini ali ob prisotnosti vaginalnega zamaška.

23. Uporabljeni režim izpostavljenosti in parjenja je odvisen od glavnega namena študije dominantne smrtnosti. Če je cilj ugotoviti, ali zadevna kemikalija povzroča dominantne smrtne mutacije same po sebi, bi bila sprejemljiva metoda z izpostavitvijo celotnega kroga spermatogeneze (npr. sedem tednov pri miših, 5–7 tretiranj na teden) in parjenjem enkrat ob koncu zadevnega kroga. Če pa je cilj opredeliti vrsto zarodnih celic, občutljivo za indukcijo dominantne smrtnosti, potem je priporočljiva enkratna ali petdnevna izpostavljenost, ki ji sledi tedensko parjenje.

Velikost odmerkov

24. Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (26). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za hematopoetski sistem), ne pa smrt ali znaki bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (27).

25. Največji tolerančni odmerek tudi ne sme negativno vplivati na uspešnost parjenja (21).

26. Preskusne kemikalije s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.

27. Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za določanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v

▼M8

uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Pri kemikalijah, ki niso toksične, je mejni odmerek za obdobje dajanja, ki traja vsaj 14 dni, 1 000 mg/kg telesne teže na dan, za obdobja dajanja, krajša od 14 dni, pa je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

28. Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, podkožno, intravenozno, topično, z vdihavanjem, oralno (z gavažo) ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo običajno ni priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter parjenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (odstavek 31). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerka.

Opažanja

29. Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in evidentirati klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. Porabo hrane je treba meriti vsaj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo nesmrtonosne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (27).

Odvzem in obdelava tkiv

30. Samice se evtanazirajo v drugi polovici brejosti, in sicer miši na 13. dan brejosti (DB), podgane pa na 14.–15. dan brejosti. Maternice se pregledajo za dominantne smrtne učinke, da se določi število ugnezditev, živih in mrtvih zarodkov ter rumenih telesc.

31. Roga maternice in jajčnika se razkrijejo, da se preštejejo rumena telesca, zarodki pa se odstranijo, preštejejo in stehtajo. Paziti je treba, da se v maternicah preverijo resorpcije, ki jih zakrivajo živi zarodki, in da se zagotovi, da so preštete vse resorpcije. Evidentira se fetalna smrtnost. Evidentirata se tudi število uspešno oplojenih samic ter število vseh ugnezditev, izgub

▼M8

pred ugnezditvijo in smrtnost po ugnezditvi (vključene zgodnje in pozne resorpcije). Poleg tega se lahko vidni zarodki v Bouinovem fiksativu ohranijo še vsaj dva tedna po pregledu večjih zunanjih nepravilnosti (28), da se zagotovijo dodatne informacije o reproduktivnih in razvojnih učinkih preskusne snovi.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

32. Podatke je treba povzeti v obliki preglednice, da se prikažejo število sparjenih samcev, število brejih samic in število nebrejih samic. Posebej je treba navesti rezultate vsakega parjenja, vključno z identiteto vsakega samca in samice. Za vsakega tretiranega samca je treba navesti interval parjenja in velikost odmerka, za vsako samico pa število živih in mrtvih ugnezditev.

33. Izguba po ugnezditvi se izračuna z določitvijo razmerja med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev iz tretirane skupine v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev iz kontrolne skupine z vehiklom/topilom.

34. Izguba pred ugnezditvijo se izračuna kot razlika med številom rumenih telesc in številom ugnezditev ali kot zmanjšanje povprečnega števila ugnezditev na samico v primerjavi s parjenji v kontrolah. Če je izguba pred ugnezditvijo ocenjena, je treba navesti tudi to.

35. Faktor dominantne smrtnosti se oceni kot: (pogini po ugnezditvi/skupno število ugnezditev na samico) × 100.

36. Navesti je treba podatke o toksičnosti in kliničnih znakih (v skladu z odstavkom 29).

Merila za sprejemljivost

37. Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili.

— Sočasna negativna kontrola je skladna z objavljenimi standardi za podatke o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov in podatki laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov, če so na voljo (glej odstavka 10 in 18).

— Sočasne pozitivne kontrole povzročajo odzive, ki so skladni z objavljenimi standardi za podatke o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov ali podatkovno zbirko laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, če je na voljo, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavka 17 in 18).

— Analizirano je bilo ustrezno število vseh ugnezditev in odmerkov (odstavek 20).

— Merila za izbor največjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 24 in 27.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

38. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmerek, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke.

▼**M8**

39. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

— se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— je pri vsaj enem poskusnem pogoju (npr. tedenskem intervalu parjenja) povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim testom, in

— če se pojavijo rezultati zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali porazdelitve podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroči dominantne smrtne mutacije v zarodnih celicah preskusnih živali. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so opisana v odstavku 44; drugi priporočeni statistični pristopi so navedeni tudi v virih (20) (21) (22) (24) (29). V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti žival.

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

— se pri nobenem od preskusnih odmerkov ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— pri nobenem poskusnem pogoju ni z odmerkom povezanega povečanja in

— če so vsi rezultati znotraj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti dominantnih smrtnih mutacij v zarodnih celicah preskusnih živali.

41. Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

42. Če odziv ni jasno negativen ali pozitiven in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje) je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami z uporabo obstoječih podatkov o poskusih, kot je upoštevanje, ali je pozitivni rezultat zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (30).

43. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključi, da je dvoumna.

44. V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti samec. Čeprav je mogoče, da so podatki o številu (npr. število ugnezditev na samico) porazdeljeni po Poissonu in/ali da so deleži (npr. delež mrtvih ugnezditev) binomsko porazdeljeni, so taki podatki pogosto nadrazpršeni (31). Tako je treba pri statistični analizi najprej uporabiti preskus prevelike in premajhne razpršenosti z uporabo testov variance, kot je Cochranov test binomske variance (32) ali Taronejev C(α)-test za binomsko nadrazpršenost (31) (33). Če se ne zazna odstopanje od binomske razpršenosti, se lahko trendi deležev med velikostmi odmerkov preverijo z uporabo Cochran-Armitageevega trendnostnega testa (34), parne primerjave s kontrolno skupino pa se lahko preverijo z uporabo Fisherjevega eksaktnega testa (35). Če se ne zazna odstopanje od Poissonove razpršenosti, se lahko

▼M8

trendi pri štetju preverijo tudi z uporabo Poissonove regresije (36), parne primerjave s kontrolno skupino pa se lahko preverijo v okviru Poissonovega modela z uporabo parnih nasprotij (36). Če se zazna znatna nadrazpršenost ali podrazpršenost, se priporočajo neparametrične metode (23) (31). Mednje spadajo testi, ki temeljijo na rangih, kot so test po Jonckheere-Terpstraju za trend (37) in Mann-Whitneyjev testi (38) za parne primerjave s kontrolno skupino z vehiklom/topilom ter testi s permutacijami, ponovnim vzorčenjem ali samovzorčenjem za primerjave trendov in parne primerjave s kontrolno skupino (31) (39).

45. Pozitivni preskus dominantne smrtnosti zagotavlja dokaze o genotoksičnosti preskusne kemikalije v zarodnih celicah tretiranega samca preskusne vrste.

46. Upoštevanje tega, ali so dobljene vrednosti v razponu preteklih kontrol ali zunaj njega, lahko zagotovi smernice pri ocenjevanju biološke pomembnosti odziva (40).

Poročilo o preskusu

47. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Povzetek.

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Priprava preskusne kemikalije:

— utemeljitev izbire vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;

▼**M8**

— priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;

— analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če je na voljo.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;

— število, starost in spol živali;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— metoda edinstvene identifikacije živali;

— pri kratkotrajnih študijah: telesna teža posameznih samcev ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo več kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

— podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);

— podatki iz študije za določanje območja;

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— utemeljitev načina dajanja;

— metode za merjenje toksičnosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostnost opazovanja živali in tehtanja;

— metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;

— dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode, če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— podrobnosti o obogatitvi okolja v kletki;

— podroben opis časovnega razporeda tretiranj in vzorčenj ter utemeljitev izbir;

— metoda za analgezijo;

— metoda za evtanazijo;

▼**M8**

— postopki za izolacijo in hrambo tkiv;

— izvor in številka serij za vse komplete in reagente (kjer je primerno);

— metode za štetje dominantnih smrtnosti;

— časovni razpored parjenja;

— uporabljene metode za določitev, ali je prišlo do parjenja;

— čas evtanazije;

— merila za štetje učinkov dominantne smrtnosti, vključno z rumenimi telesci, ugnezditvami, resorpcijami in izgubami pred ugnezditvijo, živimi ugnezditvami in mrtvimi ugnezditvami.

Rezultati:

— stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;

— telesna teža samcev v obdobjih tretiranja in parjenja;

— število sparjenih samic;

— razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;

— podatki o sočasnih in preteklih negativnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

— podatki o sočasni pozitivni kontroli;

— tabelaričen prikaz podatkov za vsako samico, vključno s: številom rumenih telesc na samico; številom ugnezditev na samico; številom resorpcij in izgub pred ugnezditvijo na samico; številom živih ugnezditev na samico; številom mrtvih ugnezditev na samico; težo zarodkov;

— povzetek zgoraj navedenih podatkov za vsako obdobje parjenja in odmerek, s pogostnostmi dominantnih smrtnosti;

— uporabljene statistične analize in metode.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Bateman, A. J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Kilbey, B. J., *et. al.* (ur.) str. 235–334, Elsevier, Amsterdam.

(3) Ehling, U. H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., in Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group „Dominant“ lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173–185.

▼**M8**

(4) Shelby, M. D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res., 352:159–167.

(5) Knudsen, I., Hansen, E. V., Meyer, O. A., in Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267–270.

(6) Anderson, D., Hughes, J. A., Edwards, A. J., in Brinkworth, M. H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively, C. A., White, D. M., Blauch, J. L., in Tarka, S. M., Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao, K. S., Cobel-Geard, S. R., Young, J. T., Hanley, T. R., Jr., Hayes, W. C., John, J. A., in Miller, R. R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80–85.

(9) Brewen, J. G., Payne, H. S., Jones, K. P., in Preston, R. J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239–249.

(10) Marchetti, F., Bishop, J. B., Cosentino, L., Moore, II, D., in Wyrobek, A. J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616–624.

(11) Marchetti, F., in Wyrobek, A. J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112–129.

(12) Adler, I. D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor, J., in Crenshaw, J. W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21-27.

(14) Generoso, W. M., Witt, K. L., Cain, K. T., Hughes, L., Cacheiro, N. L. A, Lockhart, A. M. C., in Shelby, M. D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings, S. E., Huffman, K. W., in Gallo, M. A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371–378.

(16) James, D. A., in Smith, D. M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303–314.

(17) Shelby, M. D., Cain, K. T., Hughes, L. A., Braden, P. W., in Generoso, W. M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman, P. D., Rutledge, J. C., Bishop, J. B., in Generoso, W. M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom, L. M., Palmer, A. K., in Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland, D. J., in Fox, M. (ur.), Cambridge University Press, str. 129–156.

(20) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., in Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., in Tanaka, N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso, W. M., in Piegorsch, W. W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124–141.

(23) Haseman, J. K., in Soares, E. R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton, E. B., Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353–360.

(25) Anderson, D., Hodge, M. C. E., Palmer, S., in Purchase, I. F. H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417–429.

(26) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313–319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(28) Barrow, M. V., Taylor, W. J., in Morphol, J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland, D. J. (ur.).(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., in Thybaud, V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“, Mutation. Res., 723:87–90.

(31) Lockhart, A. C., Piegorsch, W. W., in Bishop, J. B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35–58.

(32) Cochran, W. G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone, R. E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin, B. H. (1988). Test for Trend in Proportions. V: *Encyclopedia of* Statistical Sciences, zvezek 9, Kotz, S., in Johnson, N. L. (ur.), str. 334–336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox, D. R. Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter, J. M., Kutner, H. C., Nachtsheim, J., in Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, četrta izdaja, poglavji 14 in 17. McGraw-Hill, Boston.

(37) Jonckheere, R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133–145.

(38) Conover, W. J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York.

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Filadelfija, PA.

(40) Fleiss, J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

Rumeno telesce: struktura, ki izloča hormone, nastala na jajčniku na mestu folikla, iz katerega se je sprostilo jajčece. Število rumenih telesc v jajčnikih ustreza številu ovuliranih jajčec.

Dominantna smrtna mutacija: mutacija, ki nastane v zarodni celici ali se fiksira po oploditvi in povzroči smrt zarodka ali plodu.

Stopnja rodnosti: število sparjenih brejih samic glede na število sparjenih samic.

Interval parjenja: čas med koncem izpostavljenosti in parjenjem tretiranih samcev. Z uravnavanjem tega intervala se lahko ocenijo učinki kemikalij na različne vrste zarodnih celic. Pri miših, ki se parijo v 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. in 8. tednu po koncu izpostavljenosti, se merijo učinki na semenčice, kondenzirane spermatide, okrogle spermatide, pahitenske spermatocite, zgodnje spermatocite, diferencirane spermatogonije, diferenciacijske spermatogonije in spermatogonije iz matičnih celic.

Izguba pred ugnezditvijo: razlika med številom ugnezditev in številom rumenih telesc. Lahko se tudi oceni s primerjavo med skupnim številom ugnezditev na samico v tretirani in kontrolni skupini.

Izguba po ugnezditvi: razmerje med mrtvimi ugnezditvami v tretirani skupini v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v kontrolni skupini.

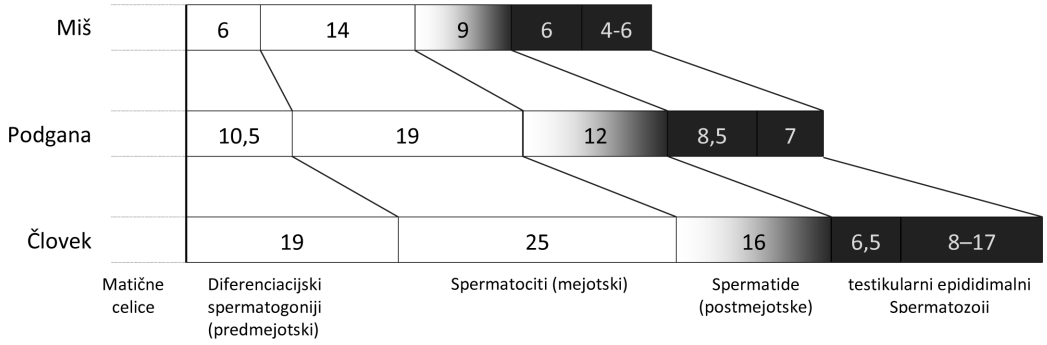
Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

▼**M8**

Dodatek 2

ČAS SPERMATOGENEZE PRI SESALCIH



Slika 1: Primerjava med trajanjem (v dnevih) razvoja moške zarodne celice pri miših, podganah in ljudeh. Popravljanje DNK se ne pojavi v osenčenih obdobjih.

Shematski prikaz spermatogeneze pri miših, podganah in ljudeh je naveden zgoraj (povzeto po Adlerju, 1996). Med nediferencirane spermatogonije spadajo: A-enojni; A-parni; in A-poravnani spermatogoniji (Hess in de Franca, 2008). A-enojni se štejejo za dejanske matične celice; zato mora za oceno učinkov na matične celice preteči vsaj 49 dni (pri miši) med zadnjim injiciranjem preskusne kemikalije in parjenjem.

Viri

Adler, I. D (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169–172.

Hess, R. A., in De Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. V: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (ur.), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼**M8**

B.23 PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V SPERMATOGONIJIH SESALCEV

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 483 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in preudarkov v zvezi z dobrobitjo živali. Pri tej spremenjeni različici preskusne metode se upoštevajo večletne izkušnje s tem preskusom ter možnosti za združevanje ali kombiniranje tega preskusa z drugimi študijami toksičnosti ali genotoksičnosti. S kombiniranjem študij toksičnosti bi se lahko zmanjšalo število živali, uporabljenih pri preskušanju toksičnosti. Ta preskusna metoda je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).

2. Namen *in vivo* preskusa kromosomskih aberacij v spermatogonijih sesalcev je opredeliti kemikalije, ki povzročijo strukturne kromosomske aberacije v spermatogonijskih celicah sesalcev (2) (3) (4). Poleg tega je ta preskus primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in procesi popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivu, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Ta preskusna metoda ni zasnovana za merjenje numeričnih anomalij; preskus se običajno ne uporablja za ta namen.

3. S tem preskusom se merijo strukturne kromosomske aberacije (kromosomskega in kromatidnega tipa) pri delitvi spermatogonskih zarodnih celic, zato se pričakuje, da se s preskusom napove povzročitev dednih mutacij v teh zarodnih celicah.

4. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI

5. V tem preskusu se običajno uporabljajo glodavci, vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, če je to znanstveno upravičeno. Standardni citogenetski pripravki mod glodavcev povzročajo mitotično (spermatogoniji) in mejotično (spermatociti) metafazo. Mitotična in mejotična metafaza se opredelita na podlagi morfologije kromosomov (4). S tem citogenetskim preskusom *in vivo* se zaznajo strukturne kromosomske aberacije pri mitozi spermatogonijev. Druge tarčne celice niso predmet te preskusne metode.

6. Da se zaznajo aberacije kromatidnega tipa v spermatogonijih, je treba pregledati prvo mitotsko delitev celic po tretiranju, preden se te aberacije v naslednjih celičnih delitvah pretvorijo v aberacije kromosomskega tipa. Dodatne informacije o tretiranih spermatocitih se lahko pridobijo z analizo kromosomskih strukturnih aberacij pri mejotskih kromosomih v diakinezi-metafazi I in metafazi II.

▼M8

7. V modu so številne generacije spermatogonijev (5), te različne vrste zarodnih celic pa so lahko različno občutljive za tretiranje s kemikalijami. Zaznane aberacije tako pomenijo skupni odziv tretiranih populacij spermatogonijev. Večina mitotičnih celic v pripravkih mod so spermatogoniji B, katerih celični cikel traja približno 26 ur (3).

8. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali njeni metaboliti ne bodo dosegli moda, ta preskus ni primeren.

NAČELO PRESKUSNE METODE

9. Običajno se živali preskusni kemikaliji izpostavijo z ustreznim načinom izpostavljenosti, ob primernem času po tretiranju pa se evtanazirajo. Pred evtanazijo se živali tretirajo z zaviralcem metafaze (npr. kolhicinom ali Colcemidom®). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz zarodnih celic ter analizirajo kromosomske aberacije v celicah v metafazi.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Usposobljenost za ta preskus je treba dokazati tako, da se pokaže sposobnost za ponovitev pričakovanih rezultatov v zvezi s pogostnostjo strukturnih kromosomskih aberacij v spermatogonijih s snovmi za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi), kot so tiste iz preglednice 1, ter dobijo pogostnosti iz negativnih kontrol, ki so v skladu s sprejemljivim razponom podatkov o kontrolah v objavljenih virih (npr. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) ali s porazdelitvijo kontrol iz preteklih preskusov laboratorija, če je na voljo.

OPIS METODE

Pripravki

Izbira živalskih vrst

11. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve zdravih mladih odraslih živali. Običajno se uporabljajo samci miši; lahko pa se uporabijo tudi samci drugih ustreznih vrst sesalcev, kadar je to znanstveno utemeljeno in da se lahko ta preskus izvede v povezavi z drugo preskusno metodo. Uporabo drugih vrst, ki niso glodavci, je treba znanstveno utemeljiti v poročilu.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

12. Pri glodavcih mora biti temperatura v prostoru z živalmi 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodavce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

▼M8

Priprava živali

13. Običajno se uporabljajo zdravi mladi samci (ob začetku tretiranja stari od 8 do 12 tednov), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji med pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami posameznih živali čim manjša in ne sme presegati ± 20 %.

Priprava odmerkov

14. Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Pogoji preskusa – topilo/vehikel

15. Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme biti sposoben kemično reagirati s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje in koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča strukturnih kromosomskih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

Pozitivne kontrole

16. Vedno je treba uporabiti živali za sočasne pozitivne kontrole, razen če je laboratorij dokazal usposobljenost za izvedbo preskusa in je v zadnjem času preskus redno uporabljal (npr. v zadnjih petih letih). Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirani in nebarvani mikroskopski preparati). Ti se lahko pridobijo tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se v laboratoriju, kjer se preskus izvaja, redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev); na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.

17. Snovi za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno povečanje pogostnosti celic s spontanimi strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Odmerke za pozitivno kontrolo je treba izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve evidentira, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Primeri snovi za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

▼M8

Preglednica 1

Primeri snovi za pozitivno kontrolo

Snovi [št. CAS] (referenčna št.)
Ciklofosfamid (monohidrat) [št. CAS 50-18-0 (št. CAS 6055-19-2)] (9)
Cikloheksilamin [št. CAS 108-91-8] (7)
Mitomicin C [št. CAS 50-07-7] (6)
Monomerni akrilamid [CAS 79-06-1] (10)
Trietilenmelamin [CAS 51-18-3] (8)

Negativne kontrole

18. Živali za negativne kontrole, tretirane samo s topilom ali vehiklom, sicer pa obravnavane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti za vsak čas vzorčenja. Če ni podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano topilo/vehikel ne povzroča kromosomskih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba za vsak čas vzorčenja vključiti tudi netretirane kontrolne živali, da se dokaže sprejemljivost kontrol z vehiklom.

POSTOPEK

Število živali

19. Velikosti skupine ob začetku študije je treba določiti z namenom, da se zagotovi vsaj pet samcev na skupino. To število živali na skupino se šteje za zadostno, da se zagotovi ustrezna statistična moč (tj. običajno sposobna zaznati vsaj podvojitev pogostnosti kromosomskih aberacij, ko je stopnja negativne kontrole 1,0-odstotna ali več z 80-odstotno verjetnostjo pri stopnji značilnosti 0,05) (3) (11). Praviloma je za študijo pri dveh časih vzorčenja s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolno skupino (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali) običajno potrebnih 45 živali.

Časovni razpored tretiranja

20. Preskusne kemikalije se običajno dajo enkrat (tj. kot eno tretiranje); lahko se uporabijo tudi drugi režimi odmerjanja, če so znanstveno utemeljeni.

21. Pri skupini z največjim odmerkom se vzorci vzamejo dvakrat po tretiranju. Čas, potreben za sprejem in metabolizem preskusnih kemikalij ter njihov učinek na dinamiko celičnega cikla, lahko vpliva na optimalni čas za zaznavo kromosomskih aberacij, zato je eno vzorčenje zgodnje in drugo pozno, izvedeno približno 24 oziroma 48 ur po tretiranju. Pri vseh drugih odmerkih je treba zgodnje vzorčenje opraviti 24 ur (tj. času, krajšem od trajanja ali enakem trajanju celičnega cikla spermatogonijev B, s čimer se izboljša verjetnost štetja prvih metafaz po tretiranju) po tretiranju, razen če je znano, da so primernejši in utemeljeni drugi časi vzorčenja.

22. Uporabijo se lahko tudi drugi časi vzorčenja. Na primer pri kemikalijah, ki povzročijo učinke, neodvisne od faze S, bi bilo lahko primerno vzorčiti bolj zgodaj (tj. prej kot v 24 urah).

▼M8

23. Uporabi se lahko režim tretiranja s ponovljenimi odmerki, na primer v povezavi s preskusom na drugi končni točki, ki uporablja 28-dnevno obdobje dajanja (npr. preskusna metoda B.58); vendar bi bile za izvedbo različnih časov vzorčenja potrebne dodatne skupine živali. Tako je treba ustreznost takega časovnega razporeda znanstveno utemeljiti za vsak primer posebej.

24. Živalim se pred evtanazijo intraperitonealno vbrizga ustrezen odmerek zaviralca metafaze (npr. Colcemid® ali kolhicin). Zatem se živali vzorčijo v ustreznem časovnem intervalu. Pri miših in podganah je ta interval približno 3–5 ur.

Velikost odmerkov

25. Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju, pri tem uporabiti iste vrste, sev in režim tretiranja kot v glavni študiji ter upoštevati priporočila za izvedbo študij za določanje območja (12). S to študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot odmerek, ki povzroči blage toksične učinke, povezane s trajanjem študije (na primer nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za hematopoetski sistem), ne pa smrti ali znakov bolečine, trpljenja ali stiske, zaradi katerih je treba živali evtanazirati (13).

26. Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v spermatogonijih (npr. zmanjšanje razmerja med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi). To zmanjšanje naj ne bi presegalo 50 %.

27. Preskusne kemikalije s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.

28. Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole (odstavek 18) in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za določanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljenih velikostih odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (tj. modo) opazi pri vseh preskušenih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo. Če preskusna kemikalija povzroča toksičnost, je treba izbrati mejni odmerek in dva nižja odmerka (kot je opisano zgoraj). Mejni odmerek pri obdobju dajanja, ki traja vsaj 14 dni, je 1 000 mg/kg telesne teže na dan, pri obdobjih dajanja, krajših od 14 dni, pa je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

▼M8

Dajanje odmerkov

29. Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, lokalno podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem ali vsadkom. Vsekakor pa je treba način izbrati tako, da zagotovi ustrezno izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo običajno ni priporočljivo, razen če je znanstveno utemeljeno, saj navadno ni fiziološko ustrezen način izpostavljenosti pri ljudeh. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko zaznajo učinki (glej odstavek 33). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerka.

Opažanja

30. Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in evidentirati klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo nesmrtonosne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (13).

Priprava kromosomov

31. Takoj po evtanaziji se iz enega ali obeh mod pridobijo suspenzije zarodnih celic, ki se nato izpostavijo hipotonični raztopini in fiksirajo po ustaljenih protokolih (npr. (2) (14) (15)). Celice se nato nanesejo na objektna stekelca in obarvajo (16) (17). Vsa stekelca morajo biti označena tako, da oseba, ki evidentira ugotovitve, ne pozna njihove identitete.

Analiza

32. Za vsako žival je treba v štetje vključiti vsaj 200 dobro vidnih metafaz (3) (11). Če je pogostnost preteklih negativnih kontrol < 1 %, je treba v štetje vključiti več kot 200 celic/žival, da se poveča statistična moč (3). Uporabiti je treba metode obarvanja, ki omogočajo opredelitev centromere.

33. Aberacije kromosomskega in kromatidnega tipa je treba evidentirati posebej in razvrstiti glede na podvrste (prelomi, izmenjave). Vrzeli je treba evidentirati, vendar jih ni treba upoštevati pri ugotavljanju, ali kemikalija povzroča znatno povečanje pojava celic s kromosomskimi aberacijami. S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so dobro usposobljene za štetje. Ob priznavanju, da postopki pripravljanja preparatov pogosto povzročijo pretrganje dela

▼M8

metafaz in posledično izgubo kromosomov, število centromer v štetih celicah torej ne sme biti manjše od $2n \pm 2$, pri čemer je n haploidno število kromosomov za zadevno vrsto.

34. Čeprav je preskus namenjen zaznavanju strukturnih kromosomskih aberacij, je pomembno, da se pogostnosti poliploidnih celic in celic z endoreduplici-ranimi kromosomi evidentirata, ko se opazita (glej odstavek 44).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

35. Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako žival je treba oceniti število celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami in število kromosomskih aberacij na celico. Ločeno je treba navesti aberacije kromatidnega in kromosomskega tipa, razvrščene glede na podvrste (prelomi, izmenjave), skupaj z njihovim številom in pogostnostmi za poskusne in kontrolne skupine. Vrzeli se evidentirajo ločeno. O pogostnosti vrzeli se poroča, vendar se običajno ne vključi v analizo celotne pogostnosti strukturnih kromosomskih aberacij. Ko se opazijo poliploidija in/ali celice z endoreduplicranimi kromosomi, se poroča o njihovem deležu.

36. Navesti je treba podatke o toksičnosti in kliničnih znakih (v skladu z odstavkom 30).

Merila za sprejemljivost

37. Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili.

— Sočasna negativna kontrola je skladna z objavljenimi standardi za podatke o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, ki naj bi na splošno znašali > 0 % in $\leq 1{,}5$ % celic s kromosomskimi aberacijami, ter podatki laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov, če so na voljo (glej odstavka 10 in 18).

— Sočasne pozitivne kontrole povzročajo odzive, ki so skladni z objavljenimi standardi za podatke o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov ali zbirko podatkov laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, če je na voljo, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavka 17 in 18).

— Analizirano je bilo ustrezno število celic in odmerkov (glej odstavka 28 in 32).

— Merila za izbor največjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 25 in 26.

38. Če se opazita mitoza in mejoza, je treba določiti razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi kot merilo citotoksičnosti za vse tretirane živali in živali negativne kontrole v celem vzorcu 100 delečih se celic na žival. Če se opazi le mitoza, je treba določiti mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah za vsako žival.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

39. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmerek, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke.

▼**M8**

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

— se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— je povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja in

— je kateri koli od rezultatov zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali porazdelitve podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če je na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroča kromosomske aberacije v spermatogonijih preskusnih živali. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena tudi v virih (11) (18). V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti žival.

41. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

— se pri nobenem od preskusnih odmerkov ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— pri nobenem poskusnem pogoju ni z odmerkom povezanega povečanja in

— če so vsi rezultati znotraj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka kromosomskih aberacij v spermatogonijih preskusnih živali. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena tudi v virih (11) (18). Negativen rezultat ne izključuje možnosti, da lahko kemikalija povzroči kromosomske aberacije v poznejših razvojnih fazah, ki niso preučene, ali genske mutacije.

42. Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

43. Če odziv ni jasno negativen ali pozitiven in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje) je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami z uporabo obstoječih podatkov o poskusih, kot je upoštevanje, ali je pozitivni rezultat zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (19).

44. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključi, da je dvoumna.

45. Povečanje števila poliploidnih celic lahko kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov in povzročanje numeričnih kromosomskih aberacij (20). Povečanje števila celic z endoreduplici-ranimi kromosomi lahko pomeni, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje poteka celičnega cikla (21) (22), kar je drugačen mehanizem povzročanja numeričnih kromosomskih sprememb kot zaviranje mitotičnih procesov (glej odstavek 2). Pojav poliploidnih celic in celic z endoreduplici-ranimi kromosomi je zato treba evidentirati ločeno.

▼M8

Poročilo o preskusu

46. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Povzetek.

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Priprava preskusne kemikalije:

— utemeljitev izbire vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu;

— priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;

— analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), kadar se izvaja.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;

— število in starost živali;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— metoda edinstvene identifikacije živali;

— pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo več kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

— podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);

▼**M8**

— podatki iz študije za določanje območja, če je bila izvedena;

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— utemeljitev načina dajanja;

— podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— razlogi za čas usmrtitve;

— metode za merjenje toksičnosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostnost opazovanja živali in tehtanja;

— metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;

— dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode, če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— podroben opis časovnega razporeda tretiranj in vzorčenj ter utemeljitev izbir;

— metoda za evtanazijo;

— metoda za analgezijo (če se uporablja);

— postopki za izolacijo tkiv;

— identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija in čas tretiranja;

— metode za pripravo preparatov;

— merila za štetje aberacij;

— število analiziranih celic na žival;

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih.

Rezultati:

— stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;

— telesna teža in teža organov ob usmrtitvi (če se uporabljajo večkratna tretiranja, telesne teže med režimom tretiranja);

— znaki toksičnosti;

— mitotični indeks;

— razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi ali drugi dokazi o izpostavljenosti ciljnemu tkivu;

— vrsta in število aberacij, navedena za vsako žival posebej;

— skupno število aberacij na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

▼M8

— število celic z aberacijami na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;

— razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;

— uporabljene statistične analize in metode;

— podatki o sočasni negativni kontroli;

— podatki o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi, standardnimi odkloni in 95-odstotnim intervalom zaupanja (kadar je na voljo) ali objavljeni podatki o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, uporabljeni za sprejemljivost rezultatov preskusa;

— podatki o sočasni pozitivni kontroli;

— spremembe v ploidnosti, če so opažene, vključno s pogostnostjo poliploidije in/ali endoreduplicranih celic.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. V: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. ur. Venitt, S., in Parry, J. M. IRL Press, Oxford, Washington DC, str. 275–306.

(3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., in Tanaka, N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R. A., in de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. V: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (ur.). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, str. 1–15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368–379. Adler, I.-D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. V: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B., in Magnusson, J. (ur.). Liss, New York, str. 477–484.

(7) Cattanach, B. M., in Pollard, C. E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472–474.

(8) Cattanach, B. M., in Williams, C. E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371–375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135–140.

▼M8

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler, I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., in Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313–319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(14) Yamamoto, K., in Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207–209.

(15) Hsu, T. C., Elder, F., in Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E. P., Breckon, G., in Ford, C. E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289–294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., in Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays. V: Kirkland, D. J. (ur.). Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115–141.

(18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., in Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. V: Kirkland, D. J. (ur.). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 184–232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87–90.

(20) Warr, T. J., Parry, E. M., in Parry, J. M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29–46.

(21) Huang, Y., Change, C., in Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362–1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Anevploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Raznolikost kromosomov: raznolikost oblik (npr. metacentrični, akrocentrični itd.) in velikosti kromosomov.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posamezne kromatide ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali organizmih.

Vrzel: akromatska lezija, ki je manjša od širine ene kromatide, z zelo majhno neporavnanostjo kromatid.

Genotoksično: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami, kromosomskimi aberacijami in anevploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajnih poškodb kromosomov.

Mitotični indeks (MI): razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje proliferacije te populacije.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Numerična anomalija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene živali.

Poliploidija: večkratnik haploidnega števila kromosomov (n), razen diploidnega števila (tj. $3n$, $4n$ in tako naprej).

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki se lahko zazna pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve in je vidna v obliki delecij in fragmentov, izmenjav.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

▼M7

▼B

B.25 **PRESKUS DEDNE TRANSLOKACIJE NA MIŠIH**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskus dedne translokacije na miših odkriva strukturalne in numerične kromosomske spremembe v zarodnih sesalskih celicah, pridobljenih pri potomcih prve generacije. Tipi odkritih kromosomskih sprememb so recipročne translokacije in, če so vključeni tudi potomci samic, izguba kromosoma X. Nosilci translokacij in samice tipa XO kažejo zmanjšano plodnost, kar se uporabi za izbor potomcev F_1 za citogenetsko analizo. Popolno sterilnost povzročijo nekateri tipi translokacij (avtosom X in tip c-t). Translokacije se citogenetsko opazujejo v mejotičnih celicah v diakinezi-metafazi I posameznih samcev, bodisi samcev F_1 ali zaroda samcev samic F_1. Samice tipa XO se citogenetsko prepozna po prisotnosti samo 39 kromosomov v mitozi kostnega mozga.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Priprave

Preskusne kemikalije se raztopijo v izotonični raztopini soli. Če so netopne, se raztopijo ali suspendirajo v ustreznem nosilcu. Uporabljajo se sveže pripravljene raztopine preskusne spojine. Če je za lažje dajanje odmerkov uporabljen nosilec, le-ta ne sme vplivati na preskusno kemikalijo ali povzročati strupenih učinkov.

Način dajanja

Načina dajanja sta običajno oralna intubacija in intraperitonealna injekcija. Ustrezni so lahko tudi drugi načini dajanja.

Preskusne živali

Zaradi lažjega vzrejnega in citološkega preverjanja se navedeni preskusi opravljajo na miših. Ne zahteva se nikakršen poseben mišji sev. Vendar pa mora biti povprečna velikost zaroda seva večja od osem in relativno konstantna.

Uporabijo se zdrave, spolno zrele živali.

▼B

Število živali

Število potrebnih živali je odvisno od frekvence spontane translokacije in minimalne stopnje indukcije, ki je potrebna za pozitiven rezultat.

Preskus se običajno opravlja z analizami potomcev samcev F_1. Preskus je treba opraviti na najmanj 500 potomcih samcih F_1 na skupino odmerka. Če se vključijo potomci samice F_1, je zahtevanih 300 samcev in 300 samic.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Na voljo naj bi bili ustrezni kontrolni podatki, izpeljani iz sočasnih in preteklih kontrol. Kadar so na voljo sprejemljivi rezultati pozitivne kontrole iz preskusov, ki so bili pred kratkim izvajani v istem laboratoriju, se ti rezultati lahko uporabijo namesto tekoče pozitivne kontrole.

Velikosti odmerka

Preskuša se ena velikost odmerka, ponavadi je to najvišji odmerek, povezan s povzročitvijo minimalnih strupenih učinkov, vendar brez vpliva na razmnoževalno vedenje ali preživetje. Da bi se določilo razmerje odmerek/odziv, sta zahtevana še dva dodatna nižja odmerka. V primeru nestrupenih kemikalij je treba živali izpostaviti maksimalni izvedljivi velikosti odmerka.

Postopek

Tretiranje in parjenje

Na voljo sta dva programa tretiranja. Najpogosteje se uporablja enkratno dajanje preskusne snovi. Preskusna snov se lahko daje tudi sedem dni na teden, in sicer 35 dni. Število parjenj po tretiranju je določeno s programom tretiranja, zagotoviti pa je treba, da se vzorčijo vse faze obdelanih zarodnih celic. Po obdobju parjenja se samice posamezno razvrstijo po kletkah. Ko samica skoti mladiče, se zabeleži datum, velikost zaroda in spol potomcev. Vsi moški potomci se odstavijo od sesanja, ženske potomke pa se izločijo, razen če se ne vključijo v preskus.

Preskus translokacijske heterozigotnosti

Uporabljata se ena od dveh možnih metod:

— preskus plodnosti potomcev F_1 in nadaljnje preverjanje možnih nosilcev translokacij s citogenetsko analizo,

— citogenetska analiza vseh potomcev samcev F_1 brez vnaprejšnje selekcije s preskusom plodnosti.

(a) Preskus plodnosti

Zmanjšano plodnost posameznih živali F_1 je mogoče ugotoviti na podlagi opazovanja velikosti zaroda in/ali analize vsebine maternice samic.

Za uporabljeni mišji sev morajo biti določena merila določanja normalne in zmanjšane plodnosti.

▼B

Opazovanja velikosti zaroda: samci F_1, ki bodo preskušani, so posamezno razporejeni po kletkah s samicami bodisi iz istega preskusa ali iz kolonije. Kletke se dnevno pregledujejo od 18. dne po parjenju. Ob skotitvi se zabeležita velikost zaroda in spol potomcev F_2, nakar se zarodi izločijo. Če se opravlja preskus na potomcih samicah F_1, se potomce F_2 iz majhnih zarodov ohrani za nadaljnje preskuse. Samice, ki so nosilke translokacij, se preverijo s citogenetsko analizo translokacije pri katerem koli izmed njihovih moških mladičev. Samice tipa X0 se prepoznajo po tem, da se razmerje spolov samci-samice med njihovimi potomci spremeni iz 1:1 na 1:2. V naslednjem postopku se normalne živali F_1 izločijo iz nadaljnjih preskusov, če prvi zarod F_2 doseže ali preseže vnaprej določeno normalno vrednost, sicer se opazuje drugi ali tretji zarod F_2.

Živali F_1, ki jih po opazovanju najmanj treh zarodov F_2 ni mogoče razvrstiti kot normalne, se nadaljnje preskušajo z analizo vsebine maternice samic, ki so se parile, ali pa se takoj podvržejo citogenetski analizi.

Analiza vsebine maternice: Zmanjšanje velikosti zaroda nosilcev translokacij je posledica embrionalne smrti, tako da visoko število mrtvih ugnezditev kaže na prisotnost translokacij e pri preskusni. Vsakega izmed samcev F_1, na katerih se bo opravljal preskus, se pari z dvema do tremi samicami. Spočetje se ugotovi tako, da se vsak dan zjutraj samice pregledajo za vaginalne zamaške. 14 do 16 dni pozneje se samice žrtvujejo in zabeležijo se žive in mrtve ugnezditve v njihovih maternicah.

(b) Citogenetska analiza

Testisi se pripravijo s tehniko sušenja na zraku. Nosilci translokacij se prepoznajo po prisotnosti multivalentnih konfiguracij v diakinezi metafaze I v primarnih spermatocitah. Zahtevani dokaz, da je žival, na kateri se opravlja preskus, nosilec translokacij e, dobimo z opazovanjem najmanj dveh celic z multivalentno asociacijo.

Če ni bila opravljena nikakršna vzrejna selekcija, se na vseh samcih F_1 opravi citogenetski pregled. Pod mikroskopom je treba prešteti najmanj 25 celic diakineze-metafaze I na samca. Pregled mitotičnih metafaz v spermatogonijih kostnega mozga je potreben pri samcih F_1 z majhnimi testisi in mejotično členitvijo pred diakinezo ali na samicah za katere se sumi, da so tipa XO. Prisotnost nenavadno dolgega in/ali kratkega kromosoma v vsaki izmed 10 celic je dokaz posebne sterilne translokacij e pri samcih (c-t tip). Nekaj translokacij avtosoma X, ki povzročajo sterilnost samcev, se lahko prepozna le z analizo proganja mitotičnih kromosomov. Prisotnost 39 kromosomov v vseh 10 mitozah je dokaz stanja XO pri samici.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele.

Navede se srednja velikost zaroda in razmerje med spoloma iz parjenj staršev ob rojstvu in odstavitvi od sesanja za vsak interval parjenja.

▼B

Za oceno plodnosti živali F_1 se prikaže srednja vrednost velikost zaroda vseh normalnih parjenj ter posamezne velikosti zarodov nosilcev translokacij F_1. Za analizo vsebine maternice se navede povprečno število živih in mrtvih vsadkov pri normalnih parjenjih ter posamezna števila živih in mrtvih vsadkov za vsako parjenje nosilcev translokacij F_1.

Za citogenetsko analizo diakineze-metafaze I se pri vsakem nosilcu translokacij navede število tipov multivalentne konfiguracije in skupno število celic.

V primeru posameznih sterilnih živali F_1 se navede skupno število parjenj in trajanje obdobja parjenja. Podajo se teže testisov in podrobnosti citogenetske analize.

V primeru samic tipa X0 se navedena srednja velikost zaroda, razmerje po spolu med potomci F_1 in rezultate citogenetske analize.

Kadar se možni nosilci translokacij vnaprej izberejo s preskusi plodnosti, je treba v tabele vključiti podatke o tem, od teh je bilo potrjenih za translokacij ske heterozigote.

Poročajo se podatki iz preskusov z negativno in pozitivno kontrolo.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— sev miši, starost živali, masa tretiranih živali,

— število starševskih živali vsakega spola v preskusni in kontrolni skupini,

— preskusni pogoji, podroben opis tretiranja, velikosti odmerka, topila, program parjenja,

— število in spol potomcev na samico, število in spol potomcev, vzrejenih za analizo translokacije,

— čas in merila analize translokacije,

— število in podroben opis nosilcev translokacij, vključno z vzrejnimi podatki in podatki o vsebini maternice, če je primerno;

— citogenetski postopki in podrobnosti mikroskopske analize, po možnosti s slikami,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

▼B

3.2 OCENA IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

▼B

B.26 **PRESKUS SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI 90-DNEVNA ŠTUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI NA GLODALCIH**

1. **METODA**

Ta metoda za preskus subkronične oralne toksičnosti ustreza metodi OECD TG 408 (1998).

1.1 UVOD

Pri ocenjevanju in vrednotenju strupenih lastnosti kemikalije se lahko določi subkronična oralna toksičnost z uporabo ponavljajočega odmerjanja, potem ko so že bile pridobljene začetne informacije o toksičnosti s preskusi akutne toksičnosti ali 28-dnevnimi preskusi toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki. Ta 90-dnevna študija daje informacije o možnih nevarnostih za zdravje, za katere je verjetno, da se pojavijo pri ponavljajoči se izpostavljenosti v daljšem časovnem obdobju, vključno z razvojem od odstavitve daleč v odraslo dobo. Študija daje informacije o glavnih toksičnih učinkih, nakaže ciljne organe in možnost kopičenja ter lahko omogoči oceno ravni izpostavljenosti brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL), ki ga je mogoče uporabiti za izbiro velikosti odmerkov pri študijah kronične toksičnosti in določanju varnostnih meril za izpostavljenost človeka.

Metoda namenja dodatno pozornost nevrološkim ciljnim učinkom ter pokaže možne učinke na imunski in reproduktivni sistem. Poudarjena je tudi potreba po skrbnem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi kar največ informacij. Študija bi morala omogočiti identifikacijo kemikalij s potencialnimi nevrotoksičnimi in imunoloških učinki ter učinki na reproduktivne organe, kar bi morebiti terjalo nadaljnje poglobljene raziskave.

Glej tudi Splošni uvod Del B.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Odmerek: je količina dane preskusne snovi. Odmerek je izražen kot masa (g, mg), kot masa preskusne snovi na enoto teže preskusne živali (npr. mg/kg) ali kot konstantna koncentracija v hrani (ppm).

Odmerjanje: je splošni izraz, ki obsega odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

NOAEL: je kratica za odmerek brez opaznih škodljivih učinkov (No Observed Adverse Effect Level) in je največji odmerek, pri katerem ne opazimo nobenega škodljivega učinka, povezanega z tretiranjem.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se 90 dni dnevo oralno daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, in sicer ena velikost odmerka na skupino. V času dajanja odmerkov je treba živali pozorno opazovati ali kažejo znake toksičnosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se izvede obdukcija, na koncu preskusa pa se usmrti tudi preživele živali in tudi na njih izvede obdukcija.

▼B

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Priprava živali**

Uporabiti je treba zdrave živali, ki so se najmanj pet dni prilagajale na laboratorijske razmere in ki predhodno niso bile uporabljene za poskuse. Poznati je treba vrsto, sev, vir, spol, težo in/ali starost poskusnih živali. Živali se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi pozicije kletk čim manjši. Vsaki živali se dodeli posebna identifikacijska številka.

1.4.2 **Priprava odmerkov**

Preskusna snov se daje z gavažo, s hrano ali s pitno vodo. Metoda oralnega dajanja odmerkov je odvisna od namena študije in od fizikalnih/kemijskih lastnosti preskusnega materiala.

Po potrebi se preskusna snov raztopi ali suspendira v primernem nosilcu. Priporočljivo je, da se, kadar koli je mogoče, najprej razmisli o uporabi vodne raztopine/suspenzije, potem o raztopini/emulziji v olju (npr. koruzno olje), nato pa šele o možni raztopini v drugih nosilcih. V primeru nosilcev, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega nosilca. Določiti je treba stabilnost preskusne snovi pri pogojih dajanja.

1.4.3 **Preskusni pogoji**

1.4.3.1 *Poskusne živali*

Priporočena vrsta je podgana, vendar se lahko uporabijo tudi druge vrste glodalcev, npr. miš. Uporabiti je treba laboratorijske seve mladih zdravih odraslih živali, ki se običajno uporabljajo. Samice morajo biti nuliparne in ne smejo biti breje. Z odmerjanjem je treba začeti čim prej po odstavitvi, v vsakem primeru pa preden živali dosežejo starost devetih tednov. Na začetku študije morajo biti razlike v teži posameznih živali čim manjše in ne smejo presegati ± 20 % povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo kronične toksičnosti, je treba v obeh študijah uporabiti živali istega seva in vira.

1.4.3.2 *Število in spol*

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 20 živali (10 samic in 10 samcev). Če so načrtovane usmrtitve med potekom študije, je treba število povečati za število živali, predvidenih za usmrtitev pred zaključkom študije. Na podlagi že poznanih lastnosti kemikalije ali bližjih analogov je treba razmisliti o vključitvi satelitne skupine desetih živali (pet na spol) v kontrolno skupino in skupino z največjim odmerkom, za opazovanje reverzibilnosti ali obstojnosti morebitnih toksičnih učinkov po tretiranju. Trajanje tega opazovalnega obdobja po tretiranju se določi glede na opažene učinke.

▼B

1.4.3.3 *Velikost odmerkov*

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in kontrolo, razen če se izvaja mejni preskus (glej 1.4.3.4). Velikosti odmerkov se lahko določijo na podlagi rezultatov študij s ponavljajočimi se odmerki ali študij za ugotavljanje območja odmerkov, pri tem pa morajo biti upoštevani vsi obstoječi toksikološki in toksikokinetični podatki, ki so na voljo v zvezi s preskusno snovjo ali sorodnimi materiali. Razen kadar zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ali bioloških učinkov preskusne snovi to ni mogoče, je treba najvišjo velikost odmerka izbrati z namenom, da se povzroči toksičnost, vendar pa ne smrt ali hudo trpljenje. Upadajoče zaporedje velikosti odmerkov je treba izbrati z namenom, da se pokažejo vse od odmerka odvisne reakcije, in je odmerek brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL) najnižji izbrani velikosti odmerka. Za upadajoče zaporedje velikosti odmerkov so pogosto optimalni dvakratni do štirikratni intervali, pogosto pa je bolje dodati še dodatno četrto preskusno skupino, kakor uporabiti zelo velike intervale (npr. več kot faktor okrog 6–10) med odmerki.

Kontrolna skupina je netretirana skupina ali kontrolna skupina, tretirana le z nosilcem, če je pri dajanju preskusne snovi ta uporabljen. Razen kar zadeva tretiranje s preskusno snovjo, morajo biti živali v kontrolni skupini obravnavane enako kakor živali v preskusni skupini. Če je uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti volumen nosilca, enak največjemu uporabljenemu volumnu. Če se preskusna snov daje s hrano in se s tem povzroči zmanjšan vnos hrane, lahko uporabimo po parih hranjeno kontrolno skupino, da se razloči zmanjšan vnos hrane zaradi okusa ali toksikoloških sprememb v preskusnem modelu.

Ustrezno je treba upoštevati naslednje lastnosti nosilca in drugih aditivov: učinke na absorpcijo, distribucijo, presnovo ali retencijo preskusne snovi; učinke na kemijske lastnosti preskusne snovi, ki lahko spremenijo njene toksične lastnosti; ter učinke na porabo hrane ali vode ali prehranjenost živali.

1.4.3.4 *Mejni preskus*

Če preskus pri eni velikosti odmerka, enakovredni najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne da opaznih škodljivih učinkov, in če toksičnost ni pričakovana glede na podatke o strukturno sorodnih snoveh, potem popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov morda ne bo potrebna. Mejni preskus se lahko uporabi za vse primere razen, kadar učinki izpostavljenosti pri človeku kažejo na potrebo po uporabi večje velikosti odmerka.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 **Dajanje odmerkov**

Živali dobivajo preskusno snov dnevno sedem dni na teden v obdobju 90 dni. Vsako odstopanje od tega režima odmerjanja, npr. pet dni na teden, je treba utemeljiti. Če se preskusna snov daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekočine, ki jo je mogoče dati naenkrat, je odvisen od velikosti poskusne živali. Volumen ne sme preseči 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, kjer je dovoljeno uporabiti 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražečih ali jedkih snoveh, ki bodo pri višjih koncentracijah običajno povzročile močnejše učinke, je treba variabilnost preskusnega volumna s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, zato da bi zagotovili konstantni volumen pri vseh odmerkih.

▼B

Pri snoveh, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne snovi ne vplivajo na običajno raven vnosa hrane ali porabe vode. Kadar se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; treba je navesti uporabljeni način. Če snov dajemo z gavažo, je treba odmerke dati vsak dan približno ob istem času in jih ustrezno prilagoditi, da se vzdržuje konstantna velikosti odmerka glede na telesno težo živali. Če se 90-dnevna študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo kronične toksičnosti, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

1.5.2 **Opazovanja**

Obdobje opazovanja mora trajati najmanj 90 dni. Živali v satelitni skupini, ki so predvidene za naknadna opazovanja, morajo primerno časovno obdobje ostati netretirane, zato da bi lahko ugotovili, ali so toksični učinki obstojni ali reverzibilni.

Splošna klinična opazovanja je treba opraviti najmanj enkrat na dan, najbolje vsak dan ob istem času, pri čemer se upošteva vrhunec pričakovanih učinkov po odmerjanju. Klinično stanje živali je treba dokumentirati. Najmanj dvakrat dnevno, običajno na začetku in na koncu vsakega dne, je treba živali pregledati, da se odkrijejo znaki obolevnosti in smrtnosti.

Najmanj enkrat pred prvo izpostavljenostjo (zaradi primerjav na istem osebku) in enkrat na teden po tem je treba opraviti natančna klinična opazovanja vseh živali. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj domače kletke, najbolje na standardnem mestu in vsakokrat ob podobnem času. Opažanja je treba skrbno dokumentirati, najbolje s pomočjo točkovanj, ki jih laboratorij, ki preskus opravlja, natančno definira. Prizadevati si je treba, da so variacije v pogojih opazovanja minimalne. Opaženi znaki morajo vključevati, vendar ne smejo biti omejeni le na, spremembe na koži, kožuhu, očeh, sluznicah, pojav sekrecije in ekskrecije ter delovanje avtonomnega živčevja (npr. lakrimacija, piloerekcija, velikost zenic, nenormalno dihanje). Dokumentirati je treba tudi spremembe v hoji, drži in reagiranju na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih in toničnih gibov, stereotipov (npr. prekomerno čiščenje, ponavljajoča se krožna premikanja) ali nenormalno vedenje (npr. samomaličenje, zadenjska hoja) (1).

Oftalmološko preiskavo z uporabo oftalmoskopa ali ustrezne enakovredne opreme je treba izvesti pred dajanjem preskusne snovi in na koncu študije, najbolje na vseh živalih, vendar vsaj v skupini z velikim odmerkom in v kontrolni skupini. Če se odkrijejo spremembe na očeh, je treba preiskati celo skupino.

Proti koncu obdobja izpostavljenosti, v nobenem primeru pa ne prej kot v11. tednu, je treba oceniti senzorične reakcije na razne dražljaje (1) (npr. akustične, vizualne in proprioceptivne dražljaje) (2), (3), (4), moč oprijema (5) in motorične aktivnosti (6). Nadaljnje podrobnosti glede možnih postopkov so podane v navedeni literaturi. Uporabiti je možno tudi druge postopke, ki so opisani drugod.

Opazovanja drugih funkcij proti koncu študije se lahko opustijo, če so podatki o funkcionalnih opazovanjih znani že iz drugih študij, v dnevnih kliničnih opazovanjih pa niso bile odkrite nobene funkcionalne pomanjkljivosti.

▼B

V izjemnih primerih se opazovanja drugih funkcij lahko opustijo tudi pri skupinah, v katerih so se znaki toksičnosti pokazali v tolikšnem obsegu, da bi znatno vplivali na rezultate funkcionalnega preskusa.

1.5.2.1 *Telesna teža in poraba hrane/vode*

Vse živali je treba stehtati najmanj enkrat na teden. Meritve porabe hrane je treba opraviti najmanj tedensko. Če se preskusna snov daje s pitno vodo, je treba najmanj tedensko izmeriti tudi porabo vode. Poraba vode se lahko upošteva tudi pri študijah odmerjanja s hrano ali z gavažo, pri katerih se vedenje glede pitja lahko spremeni.

1.5.2.2 *Hematologija in klinična biokemija*

Vzorce krvi je treba vzeti na imenovanem mestu in jih hraniti, če je to potrebno, v ustreznih pogojih. Na koncu preskusnega obdobja se vzorci odvzamejo tik pred usmrtitvijo ali med samim postopkom usmrtitve živali.

Na koncu preskusnega obdobja in pri morebitnih vmesnih odvzemih vzorcev krvi je treba izvesti naslednje hematološke teste: hematokrit, koncentracijo hemoglobina, število eritrocitov, skupna in diferencialna krvna slika, število trombocitov in meritev časa/potenciala koagulacije krvi.

Klinične biokemične določitve za ugotavljanje glavnih toksičnih učinkov v tkivih in zlasti učinkov na ledvica in jetra, je treba opraviti na vzorcih krvi, pridobljenih od vsake živali tik pred usmrtitvijo ali med samim postopkom usmrtitve (to ne velja za živali, ki so najdene poginjajoče in/ali poginule med postopkom). Podobno kot pri hematoloških preiskavah se vmesno vzorčenje lahko opravi tudi za klinične biokemične preskuse. Priporočeno je, da živali pred jemanjem vzorcev krvi čez noč postimo ([1]). Določitve v plazmi ali serumu morajo vključevati natrij, kalij, glukozo, skupni holesterol, sečnino, sečninski dušik v krvi, kreatinin, skupne beljakovine in albumin ter več kot dva encima, ki kažeta na hepatocelularne učinke (kot so alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, alkalna fosfataza, gamaglutamil-transpeptidaza, in sorbitol-dehidrogenaza). Vključiti je možno tudi meritve dodatnih encimov (jetrnih ali drugega izvora) in žolčnih kislin, ki lahko v nekaterih okoliščinah dajo koristne informacije.

Po izbiri se lahko v zadnjem tednu študije opravijo analize urina, dobljenega z zbiranjem v določenih časovnih obdobjih: videz, volumen, osmolalnost ali specifična teža, pH, beljakovine, glukoza in kri/krvne celice.

Poleg tega bi bilo treba razmisliti o preiskavi splošnih serumskih markerjev poškodb tkiva. Kadar znane lastnosti preskusne snovi lahko vplivajo na ustrezne sorodne presnovne profile ali kadar se pričakujejo takšni vplivi, je treba določiti kalcij, fosfor, vrednost trigliceridov na tešče, specifične hormone, methemoglobin in holinesterazo. Te parametre je treba določiti pri kemikalijah določenih razredov oziroma odvisno od primera.

([1]) Za več meritev v serumu in plazmi, zlasti pa za glukozo, je priporočeno, da se živali čez noč postijo. Glavni razlog za to je, da bi povečana variabilnost, ki bi bila neizogibno posledica nepoštenja, prikrila šibkejše učinke in otežila interpretacijo. Po drugi strani pa poštenje čez noč lahko vpliva na splošno presnovo živali in zlasti v študijah prehranjevanja zmoti dnevno izpostavljenost preskusni snovi. Če se uporabi poštenje čez noč, je treba klinične biokemične analize izvesti po opravljenih funkcionalnih opazovanjih v okviru študije.

▼B

V glavnem mora biti pristop fleksibilen, odvisno od vrste in od opaženega in/ali pričakovanega učinka dane snovi.

Če predhodni podatki o normalnih vrednostih niso primerni, je treba razmisliti o določitvi hematoloških in kliničnih biokemičnih parametrov pred odmerjanjem preskusne snovi; praviloma ni priporočeno, da se ti podatki določijo pred tretiranjem (7).

1.5.2.3 *Obdukcija*

Na vseh živalih iz študije je treba opraviti popolno in natančno obdukcijo, ki obsega natančno preiskavo zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Z jeter, ledvic, nadledvičnih žlez, mod, obmodka, maternice, jajčnikov, priželjca, vranice, možganov in srca vseh živali (to ne velja za živali, ki so najdene poginjajoče in/ali usmrčene med postopkom) je treba, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva, nato pa, čim prej po disekciji, določiti njihovo mokro težo, zato da se prepreči sušenje.

Naslednja tkiva je treba shraniti v sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in za predvidene nadaljnje histopatološke preiskave: vse makroskopske lezije, možgane (reprezentativna področja, ki vključujejo velike možgane, male možgane in možgansko deblo/pons), hrbtenjačo (s treh predelov: vratnega, srednjega prsnega in ledvenega), hipofizo, ščitnico, obščitnico, priželjc, požiralnik, slinavke, želodec, tanko in debelo črevo (vključno s Peyerjivimi poloji), jetra, trebušno slinavko, ledvica, nadledvični žlezi, vranico, srce, sapnik in pljuča (vpihnjena s fiksativom, nato vstavljena v ustrezno raztopino), aorto, spolne žleze, maternico, akcesorne spolne organe, mlečne žleze samic, prostato, sečni mehur, žolčnik (miš), bezgavke (najbolje eno bezgavko, ki zajema predel poti odmerjanja, in drugo bezgavko oddaljeno od tega predela, zato da so vključeni tudi sistemski učinki), periferni živec (bedrni ali golenični) najbolje v neposredni bližini mišice, rezino kostnega mozga (in/ali sveži aspirat kostnega mozga), kožo in oči (če so bile med oftalmološkimi preiskavami ugotovljene spremembe). Klinične in druge ugotovitve lahko pokažejo, da bo treba pregledati dodatna tkiva. Shraniti je treba tudi vse organe, za katere je na podlagi znanih lastnosti preskusne snovi verjetno, da bi lahko bili ciljni organi.

1.5.2.4 *Histopatologija*

V celoti je treba opraviti histopatološke preiskave shranjenih organov in tkiv vseh živali iz kontrolne skupine in skupine z velikim odmerkom. Če so v skupini z velikim odmerkom opažene spremembe, povezane s tretiranjem, je treba te preiskave razširiti tudi na skupine vseh drugih odmerkov.

Preiskati je treba vse makroskopske lezije.

Če je uporabljena satelitna skupina, je treba histopatološke preiskave opraviti na tkivih in organih, na katerih so bili pri tretiranih skupinah vidni učinki.

▼B

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 PODATKI

Predložiti je treba podatke za vsako posamezno žival. Nadalje je treba vse podatke prikazati v obliki preglednice, iz katere so za vsako preskusno skupino razvidni naslednji podatki: število živali na začetku preskusa in število živali, med preskusom najdenih mrtvih ali usmrčenih iz humanih razlogov, nato čas smrti oziroma humane usmrtitve, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis opaženih znakov toksičnosti, vključno s časom, ko so toksični učinki prvikrat nastopili, njihovim trajanjem in jakostjo, število živali s poškodbami, vrsto poškodb in odstotek živali z vsako posamezno vrsto poškodbe.

Če je mogoče, je treba numerične podatke ovrednotiti s primerno splošno sprejeto statistično metodo. Statistične metode in podatke, ki se analizirajo, je treba določiti pri načrtovanju študije.

2.2 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

2.2.1 **Preskusna snov:**

— fizikalno stanje, čistost in fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijski podatki,

— nosilec (po potrebi): utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

2.2.2 **Vrsta poskusnih živali:**

— uporabljena vrsta in sev,

— število, starost in spol živali,

— izvor, pogoji vzdrževanja, hrana ipd.,

— teža posameznih živali na začetku preskusa.

2.2.3 **Preskusni pogoji:**

— utemeljitev izbire velikosti odmerka,

— podatki o formulaciji preskusne snovi/priprave hrane, dosežena koncentracija, stabilnost in homogenost pripravka,

— podatki o dajanju preskusne snovi,

— dejanski odmerki (mg/kg telesne teže/dan) in po potrebi faktor za preračunavanje koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek,

— podatki o kakovosti hrane in vode.

2.2.4 **Rezultati:**

— telesna teža in spremembe v telesni teži,

— po potrebi podatki o porabi hrane in vode,

— podatki o toksičnem učinkovanju glede na spol in velikost odmerka, vključno z znaki toksičnosti,

▼B

— vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (ali so reverzibilna ali ne),

— rezultati oftalmoloških preiskav,

— ocena senzorične aktivnosti, moči oprijema in motorične aktivnosti (kadar so na voljo),

— hematološki testi z ustreznimi normalnimi vrednostmi,

— klinični biokemični preskusi z ustreznimi normalnimi vrednostmi,

— terminalna teža telesa, teže organov in razmerje teža organa/teža telesa,

— ugotovitve obdukcije,

— natančen opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— podatki o absorpciji, če so na voljo,

— statistična obdelava rezultatov, po potrebi.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

3. **LITERATURA**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., I, 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198–201.

▼B

B.27 **PRESKUS SUBKRONIČNE ORALNE TOKSIČNOSTI 90-DNEVNA ŠTUDIJA ORALNE TOKSIČNOSTI S PONAVLJAJOČMI SE ODMERKI NA NEGLODALCIH**

1. **METODA**

Ta metoda za preskus subkronične oralne toksičnosti ustreza metodi OECD TG 409 (1998).

1.1 UVOD

Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih lastnosti kemikalije se lahko določi subkronična toksičnost z uporabo ponavljajočega odmerjanja, potem ko so že bile pridobljene začetne informacije o toksičnosti s preskusi akutne toksičnosti ali 28-dnevnimi preskusi toksičnosti pri ponavljajočih se odmerkih. Ta 90-dnevna študija daje informacije o možnih nevarnostih za zdravje, za katere je verjetno, da se pojavijo pri ponavljani izpostavljenosti v obdobju naglega razvoja do mlade odrasle dobe. Študija daje informacije o glavnih toksičnih učinkih, pokaže ciljne organe in možnosti kopičenja ter lahko omogoči oceno ravni izpostavljenosti brez opaznih škodljivih učinkov, ki jo je mogoče uporabiti za izbiro velikosti odmerka pri preiskavah kronične toksičnosti in za določitev varnostnih meril za izpostavljenost človeka.

Preskusna metoda omogoča ugotavljanje škodljivih učinkov izpostavljenosti kemikalijam pri neglodalcih in se lahko uporablja le v naslednjih primerih:

— kadar učinki, ugotovljeni v drugih študijah, nakazujejo potrebo po razjasnitvi/karakterizaciji pri drugi, neglodalski vrsti, ali

— kadar toksikokinetične študije kažejo na to, da je uporaba določene vrste neglodalcev najbolj primerna izbira laboratorijske živali ali

— kadar drugi posebni razlogi upravičujejo uporabo neglodalske vrste.

Glej tudi Splošni uvod Del B.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Odmerek: je količina dajane preskusne snovi. Odmerek je izražen kot masa (g, mg), kot masa preskusne snovi na enoto teže poskusne živali (npr. mg/kg) ali kot konstantna koncentracija v hrani (ppm).

Odmerjanje: je splošni izraz, ki obsega odmerek, njegovo pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

NOAEL: je kratica za odmerek brez opaznih škodljivih učinkov (No Observed Adverse Effect Level) in je največji odmerek, pri katerem ne opazimo nobenega škodljivega učinka, povezanega z tretiranjem.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se v obdobju 90 dni dnevno oralno daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam poskusnih živali, in sicer ena velikost odmerka na skupino. V času dajanja snovi natančno opazujemo, ali živali kažejo znake toksičnosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se izvede obdukcija, na koncu preskusa pa se usmrtijo tudi preživele živali in tudi na njih se izvede obdukcija.

▼B

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Izbira živalskih vrst**

Neglodalska vrsta, ki se običajno uporablja, je pes, ki mora biti določene pasme; pogosto se uporablja angleški brak. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, denimo svinja ali pritlikava svinja. Uporaba primatov se ne priporoča in njihovo uporabo je treba upravičiti. Uporabiti je treba mlade, zdrave živali, v primeru psa je najbolje, da se odmerjanje začne pri 4–6 mesecih, nikakor pa ne pozneje kot pri 9 mesecih starosti. Kadar se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo kronične toksičnosti, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto/pasmo.

1.4.2 **Priprava živali**

Uporabiti je treba zdrave mlade živali, ki so se prilagodile na laboratorijske razmere in ki predhodno niso bile uporabljene za poskuse. Trajanje aklimatizacije je odvisno od izbrane poskusne vrste in njenega vira. Priporoča se najmanj pet dni za pse ali svinje, gojene za ta namen v domačem laboratoriju, in najmanj dva tedna za iste živali, če so pridobljene iz zunanjega vira. Poznati je treba vrsto, sev, vir, spol, težo in/ali starost poskusnih živali. Živali je treba naključno dodeliti kontrolni in tretirani skupini. Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi pozicije kletk čim manjši. Vsaki živali je treba dodeliti enkratno identifikacijsko številko.

1.4.3 **Priprava odmerkov**

Preskusna snov se lahko daje s hrano, pitno vodo, gavažo ali kapsulami. Metoda oralnega dajanja je odvisna od namena študije in od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusnega materiala.

Po potrebi se preskusna snov raztopi ali suspendira v primernem nosilcu. Priporočljivo je, da se, kadar koli je mogoče, najprej razmisli o uporabi vodne raztopine/suspenzije, potem o raztopini/emulziji v olju (npr. koruzno olje), nato pa šele o možni raztopini v drugih nosilcih. V primeru nosilcev, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega nosilca. Določiti je treba stabilnost preskusne snovi v pogojih dajanja.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 **Število in spol živali**

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj osem živali (štiri samice in štiri samce). Če so načrtovane usmrtitve med potekom študije, je treba število povečati za število živali, predvidenih za usmrtitev pred zaključkom študije. Število živali na koncu študije mora biti primerno za smiselno ovrednotenje toksičnih učinkov. Na podlagi že poznanih lastnosti snovi ali bližjih analogov je treba razmisliti o vključitvi satelitne skupine osmih živali (štiri na spol) v kontrolno skupino in skupino z največjim odmerkom, za opazovanje reverzibilnosti ali perzistence morebitnih toksičnih učinkov po tretiranju. Trajanje tega opazovalnega obdobja po tretiranju se določi glede na opažene učinke.

▼B

1.5.2 **Odmerjanje**

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in istočasno kontrolo, razen če se izvaja mejni preskus (glej 1.5.3). Velikosti odmerkov se lahko določijo na podlagi rezultatov študij s ponavljajočim odmerjanjem ali študij za ugotavljanje območja odmerkov, pri tem pa morajo biti upoštevani vsi obstoječi toksikološki in toksikokinetični podatki, ki so na voljo v zvezi s preskusno snovjo ali sorodnimi materiali. Razen kadar zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ali bioloških učinkov preskusne snovi to ni mogoče, je treba najvišjo velikost odmerka izbrati z namenom, da se povzroči toksičnost, ne pa smrt ali hudo trpljenje. Upadajoče zaporedje velikosti odmerkov je treba izbrati z namenom, da se pokažejo vse od odmerka odvisne reakcije, in je velikost odmerka brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL) najnižja izbrana velikost odmerka. Za določanje upadajočega zaporedja velikosti odmerkov so pogosto najprimernejši dvakratni do štirikratni intervali, večinoma pa je bolje dodati dodatno, četrto preskusno skupino, kakor uporabiti zelo velike intervale (npr. več kot faktor okrog 6–10) med odmerki.

Kontrolna skupina je netretirana skupina ali skupina, tretirana z nosilcem, če je pri dajanju preskusne snovi ta uporabljen. Razen kar zadeva tretiranje s preskusno snovjo, morajo biti živali v kontrolni skupini obravnavane enako kakor živali v preskusni skupini. Če je uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti volumen nosilca, enak največjemu uporabljenemu volumnu. Če se preskusna snov daje s hrano in se s tem povzroči zmanjšan vnos hrane, lahko uporabimo po parih hranjeno kontrolno skupino, da se razloči zmanjšan vnos hrane zaradi okusa ali toksikoloških sprememb v preskusnem modelu.

Ustrezno je treba upoštevati naslednje lastnosti nosilca in drugih dodatkov: učinke na absorpcijo, distribucijo, presnovo ali retencijo preskusne snovi; učinke na kemijske lastnosti preskusne snovi, ki lahko spremenijo njene toksične lastnosti; ter učinke na porabo hrane ali vode ali prehranjenost živali.

1.5.3 **Mejni preskus**

Če preskus pri eni velikosti odmerka, enakovredni najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne da opaznih škodljivih učinkov in če toksičnost ni pričakovana glede na podatke o strukturno sorodnih snoveh, potem popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov morda ne bo potrebna. Mejni preskus se lahko uporabi v vseh primerih razen, kadar učinki izpostavljenosti pri človeku kažejo na potrebo po uporabi višje velikosti odmerka.

1.5.4 **Dajanje odmerkov**

Živali dobivajo preskusno snov dnevno sedem dni na teden v obdobju 90 dni. Vsako odstopanje od tega režima odmerjanja, npr. pet dni na teden, je treba utemeljiti. Če se preskusna snov daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največji volumen tekočine, ki jo je mogoče dati naenkrat, je odvisen od velikosti poskusne živali. Volumen naj bo čim manjši. Razen pri dražečih ali jedkih snoveh, ki bodo pri višjih koncentracijah običajno povzročile močnejše učinke, je treba variabilnost preskusnega volumna s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, zato da bi zagotovili konstantni volumen pri vseh odmerkih.

▼B

Pri snoveh, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je nujno zagotoviti, da količine uporabljene preskusne snovi ne vplivajo na običajno raven vnosa hrane ali porabe vode. Kadar se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno težo; treba je navesti uporabljeni način. Če snov dajemo z gavažo ali kapsulo, je treba odmerke dati vsak dan približno ob istem času in jih ustrezno prilagoditi, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali. Če se 90-dnevna študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo kronične toksičnosti, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

1.5.5 **Opazovanja**

Opazovano obdobje mora trajati najmanj 90 dni. Živali v satelitni skupini, ki so predvidene za naknadna opazovanja, se za primerno časovno obdobje ne tretira, zato da bi lahko ugotovili, ali so toksični učinki obstojni ali reverzibilni.

Splošna klinična opazovanja je treba opraviti najmanj enkrat na dan, najbolje vsak dan ob istem času, pri čemer se upošteva vrhunec pričakovanih učinkov po odmerjanju. Klinično stanje živali je treba dokumentirati. Najmanj dvakrat dnevno, običajno na začetku in na koncu vsakega dne, je treba živali pregledati, da se odkrijejo znaki obolevnosti in smrtnosti.

Najmanj enkrat pred prvo izpostavljenostjo (zaradi primerjav na istem osebku) in enkrat na teden po tem je treba opraviti natančna klinična opazovanja vseh živali. Ta opazovanja je treba, če je mogoče, opraviti zunaj domače kletke, na standardnem mestu in vsakokrat ob podobnem času. Prizadevati si je treba, da so variacije v pogojih opazovanja minimalne. Znake toksičnosti je treba skrbno dokumentirati, vključno s časom, ko so nastopili, njihovo jakostjo in trajanjem. Opazovanja morajo obsegati, vendar ne smejo biti omejena na, spremembe na koži, kožuhu, očeh, sluznicah, pojav sekrecije in ekskrecije ter delovanje avtonomnega živčevja (npr. lakrimacija, piloerekcija, velikost zenic, nenormalno dihanje). Dokumentirati je treba tudi spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost zgibkov, stereotipnega vedenja (npr. prekomerno čiščenje, ponavljajoča se krožna premikanja) ali vsako nenormalno vedenje.

Oftalmološko preiskavo z uporabo oftalmoskopa ali ustrezne enakovredne opreme je treba izvesti pred dajanjem preskusne snovi in na koncu študije, najbolje na vseh živalih, vendar vsaj v skupini z velikim odmerkom in v kontrolni skupini. Če se odkrijejo spremembe na očeh, povezane z tretiranjem, je treba preiskati celo skupino.

1.5.5.1 *Telesna teža in poraba hrane/vode*

Vse živali je treba stehtati najmanj enkrat na teden. Meritve porabe hrane je treba opraviti vsaj tedensko. Če se preskusna snov daje s pitno vodo, je treba najmanj enkrat tedensko izmeriti tudi porabo vode. Poraba vode se lahko upošteva tudi pri študijah odmerjanja s hrano ali z gavažo, pri katerih se vedenje glede pitja lahko spremeni.

▼B

1.5.5.2 *Hematologija in klinična biokemija*

Vzorce krvi je treba vzeti na imenovanem mestu in hraniti, kadar je primerno, v ustreznih pogojih. Na koncu preskusnega obdobja se vzorci odvzamejo tik pred usmrtitvijo ali med samim postopkom usmrtitve živali.

Na začetku študije, nato bodisi v mesečnih intervalih bodisi na sredi preskusnega obdobja in na koncu preskusnega obdobja je treba opraviti hematološke preiskave, vključujoč krvno sliko levkocitov, število trombocitov in meritev časa/potenciala koagulacije krvi, protrombinski čas ali tromboplastinski čas.

Klinične biokemične določitve za ugotavljanje glavnih toksičnih učinkov v tkivih, zlasti učinkov na ledvica in jetra, je treba opraviti na vzorcih krvi, pridobljenih od vseh živali na začetku študije, nato bodisi v mesečnih intervalih bodisi na sredi preskusnega obdobja in na koncu preskusnega obdobja. Testna področja, o katerih je treba razmisliti, so elektrolitsko ravnotežje, presnova ogljikovodikov ter delovanje jeter in ledvic. Na izbor določenih testov bodo vplivala opažanja glede načina delovanja preskusne snovi. Pred odvzemom krvi je treba živali postiti za obdobje, primerno za posamezno vrsto. Predlagane določitve vključujejo kalcij, fosfor, klorid, natrij, kalij, glukozo na tešče, alanin-aminotransferazo, aspartat-aminotransferazo, ornitin-dekarboksilazo, gamaglutamil-transpeptidazo, sečninski dušik, albumin, kreatinin v krvi, skupni bilirubin in skupne serumske beljakovine.

Urinsko analizo je treba opraviti vsaj na začetku študije, nato na sredi preskusnega obdobja in še na koncu preskusnega obdobja, in sicer na urinu, ki je zbran v določenih časovnih obdobjih. Meritve pri urinski analizi naj vključujejo videz, volumen, osmolalnost ali specifično težo, pH, beljakovine, glukozo in kri/krvne celice. Če je treba preiskavo opaženih učinkov razširiti, se lahko uporabijo dodatni parametri.

Poleg tega bi bilo treba razmisliti o preiskavi splošnih markerjev poškodb tkiva. Za ustrezno toksikološko ovrednotenje bo morebiti treba določiti tudi lipide, hormone, razmerje kisline/baze, methemoglobin in inhibicijo holinesteraze. Če je treba opazovanje opaženih učinkov razširiti, se lahko opravijo dodatne klinične biokemijske analize. Te je treba določiti pri kemikalijah določenih razredov oziroma odvisno od primera.

V glavnem mora biti pristop fleksibilen, odvisno od vrste in od opaženega in/ali pričakovanega učinka dane snovi.

1.5.5.3 *Obdukcija*

Na vseh živalih iz študije je treba opraviti popolno in natančno obdukcijo, ki obsega skrbno preiskavo zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Z jeter z žolčnikom, ledvic, nadledvičnih žlez, mod, obmodka, jajčnikov, maternice, ščitnice (z obščitnicami), priželjca, vranice, možganov in srca vseh živali (to ne velja za živali, ki so najdene poginjajoče in/ali usmrčene med postopkom) je treba ustrezno očistiti vsa priraščena tkiva, nato pa določiti njihovo mokro težo, čim prej po disekciji, zato da se prepreči sušenje.

▼B

Naslednja tkiva je treba shraniti v sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in za predvidene nadaljnje histopatološke preiskave: vse makroskopske poškodbe, možgane (reprezentativna področja, ki vključujejo velike možgane, male možgane in možgansko deblo/pons), hrbtenjačo (s treh predelov: vratnega, srednjega prsnega in ledvenega), hipofizo, oči, ščitnico, obščitnico, priželjc, požiralnik, slinavke, želodec, tanko in debelo črevo (vključno s Peyerjivimi poloji), jetra, žolčnik, trebušno slinavko, ledvica, nadledvični žlezi, vranico, srce, sapnik in pljuča, aorto, spolne žleze, maternico, pomožne spolne organe, mlečne žleze samic, prostato, sečni mehur, bezgavke (priporočljivo, eno bezgavko, ki zajema predel poti odmerjanja preskusne snovi, in drugo bezgavko oddaljeno od tega predela, zato da so vključeni tudi sistemski učinki), periferni živec (ishiadični ali tibialni) najbolje v neposredni bližini mišice, rezino kostnega mozga (in/ali sveži aspirat kostnega mozga) in kožo. Klinične in druge ugotovitve lahko pokažejo, da bo treba pregledati dodatna tkiva. Shraniti je treba tudi vse organe, za katere je na podlagi znanih lastnosti preskusne snovi verjetno, da so ciljni organi.

1.5.5.4 *Histopatologija*

V celoti je treba opraviti histopatološke preiskave shranjenih organov in tkiv vsaj pri vseh živalih iz kontrolne skupine in skupine z velikim odmerkom. Če so v skupini z velikim odmerkom opažene spremembe, povezane s tretiranjem, je treba te preiskave razširiti tudi na skupine vseh drugih odmerkov.

Preiskati je treba vse makroskopske poškodbe.

Če je uporabljena satelitna skupina, je treba histopatološke preiskave opraviti na tkivih in organih, na katerih so bili vidni učinki v tretiranih skupinah.

2. PODATKI IN POROČANJE

2.1 PODATKI

Predložiti je treba podatke za vsako posamezno žival. Nadalje je treba vse podatke prikazati v obliki preglednice, iz katere so za vsako preskusno skupino razvidni naslednji podatki: število živali na začetku preskusa in število živali, med preskusom najdenih mrtvih ali usmrčenih iz humanih razlogov, čas smrti oziroma usmrtitve iz humanih razlogov, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis opaženih znakov toksičnosti, vključno s časom, ko so toksični učinki prvikrat nastopili, njihovim trajanjem in jakostjo, število živali s poškodbami, vrsta poškodb in odstotek živali z vsako posamezno vrsto poškodbe.

Če je mogoče, je treba numerične podatke ovrednotiti s primerno splošno sprejeto statistično metodo. Statistične metode in podatke, ki se analizirajo, je treba določiti pri načrtovanju študije.

2.2 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

▼B

2.2.1 **Preskusna snov:**

— fizikalno stanje, čistost in fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijski podatki,

— nosilec (po potrebi): utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

2.2.2 **Vrsta poskusnih živali:**

— uporabljena vrsta in sev,

— število, starost in spol živali,

— vir, pogoji vzdrževanja, hrana ipd.,

— teža posameznih živali na začetku preskusa.

2.2.3 **Pogoji preskusa:**

— utemeljitev izbire velikosti odmerka,

— podatki o formulaciji preskusne snovi/priprave hrane, dosežena koncentracija, stabilnost in homogenost pripravka,

— podatki o dajanju preskusne snovi,

— dejanski odmerki (mg/kg telesne teže/dan) in po potrebi faktor za preračunavanje koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek,

— podatki o kakovosti hrane in vode.

2.2.4 **Rezultati:**

— telesna teža/spremembe v telesni teži,

— po potrebi podatki o porabi hrane in porabi vode,

— podatki o toksičnem učinkovanju glede na spol in velikost odmerka, vključno z znaki toksičnosti,

— vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (ali so reverzibilna ali ne),

— oftalmološka preiskava,

— hematološki testi z ustreznimi normalnimi vrednostmi,

— klinični biokemični preskusi z ustreznimi normalnimi vrednostmi,

— terminalna teža telesa, teže organov in razmerje med težo organa in telesno težo,

— ugotovitve obdukcije,

— natančen opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— podatki o absorpciji, če so na voljo,

— statistična obdelava rezultatov, po potrebi.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

▼B

B.28 **ŠTUDIJA SUBKRONIČNE STRUPENOSTI V STIKU S KOŽO 90-DNEVNA ŠTUDIJA S PONOVLJENIM DERMALNIM ODMERKOM NA GLODALCIH**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se daje dnevno na kožo v graduiranih odmerkih nekaj skupinam preskusnih živali, po en odmerek na skupino v obdobju 90 dni. V obdobju dajanja se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi nekropsija, po zaključku preskusa pa se nekropsija opravi tudi na preživelih živalih.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Priprave**

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine. Pred samim preskusom se na hrbtnem predelu telesa preskusnih živali ostriže krzno. Lahko se ga obrije, vendar je treba to opraviti približno 24 ur pred preskusom. Živalim je običajno treba krzno ponovno ostriči ali obriti približno v tedenskih časovnih presledkih. Med striženjem ali britjem krzna je treba paziti, da se ne odrgne kožo. Za nanos preskusne snovi je treba očistiti najmanj 10 % telesne površine. Pri odločitvi o področju, ki ga je treba očistiti, in velikosti pokrivala, je treba upoštevati maso živali. Pri preskušanju trdnih snovi, ki jih je, kadar je primerno, mogoče uprašiti, je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Tekoče preskusne snovi se ponavadi uporabljajo nerazredčene. Snovi se nanaša vsak dan pet do sedem dni na teden.

1.6.2 *Preskusni pogoji*

1.6.2.1 Preskusne živali

Uporabijo se odrasla podgana, kunec ali morski prašiček. Mogoče je uporabiti tudi druge vrste, vendar je njihovo uporabo treba utemeljiti. Na začetku preskusa nihanje v teži ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti. Kadar se subkronična dermalna študija izvaja kot predhodnica dolgodobne študije, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto in sev.

▼B

1.6.2.2 Število in spol

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 20 živali (10 samic in 10 samcev) z zdravo kožo. Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitsko skupino 20 živali (10 živali na spol) tretira z odmerkom visoke velikosti 90 dni in na njih v 28 dneh po tretiranju opazuje povratnost, obstojnost ali zapozneli pojav strupenih učinkov.

1.6.2.3 Velikosti odmerka

Zahtevane so najmanj tri velikosti odmerka s kontrolno skupino ali kontrolno skupino nosilca, v kolikor je uporabljen nosilec. Čas izpostavljenosti naj traja najmanj šest ur na dan. Preskusno snov je treba nanesti vsak dan približno ob enakem času, količino nanesene snovi pa prilagajati v časovnih presledkih (tedensko ali dvotedensko), da se ohrani konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali. Razen tretiranja s preskusno snovjo je treba z živalmi v kontrolni skupini ravnati na popolnoma enak način kot z živalmi iz preskusne skupine. Kadar se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec, ga je treba na kontrolni skupini odmeriti na enak način kot na preskusnih skupinah, odmerek nosilca pa naj bo enak, kot pri preskusni skupini z najvišjo velikostjo odmerka. Najvišja velikost odmerka bi morala povzročiti strupene učinke, vendar sme povzročiti malo oziroma nobenega smrtnega primera. Najnižja velikost odmerka ne sme povzročiti nikakršnih znakov strupenosti. Kadar je na razpolago uporabna ocena izpostavljenost človeka, mora najnižja velikost to presegati. V najboljšem primeru mora srednja velikost odmerka povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če je uporabljena več kot ena srednja velikost odmerka, je treba te velikosti razporediti tako, da dobimo stopnjevanje strupenih učinkov. Za pomenljivo oceno rezultatov mora biti pojav smrtnih primerov v skupinah z nizkim in srednjim odmerkom ter v kontrolnih skupinah nizek.

Če nanos preskusne snovi povzroči hudo vnetje kože, je treba koncentracijo zmanjšati, kar ima lahko za posledico zmanjšanje ali odsotnost strupenih učinkov pri visoki velikosti odmerka. Če je koža hudo poškodovana, bo morda treba zaključiti študijo in začeti novo študijo z nižjimi koncentracijami.

1.6.3 Mejni preskus

Če predhodna študija pri velikosti odmerka 1 000 mg/kilogram, ali pri višji velikosti odmerka, povezani z možno izpostavljenostjo človeka, kadar je ta poznana, ne pokaže nikakršnih znakov strupenih učinkov, nadaljnji preskusi verjetno ne bodo potrebni.

1.6.4 Čas opazovanja

Preskusne živali je treba dnevno opazovati, da bi se odkrili znaki strupenosti. Zabeležiti je treba čas smrti in čas, ko se znaki strupenosti pojavijo in izginejo.

▼B

1.6.5 P o s t o p e k

Živali je treba hraniti v kletkah vsako posebej. Najprimerneje je, da se živalim odmerek preskusne snovi daje sedem dni na teden, v obdobju 90 dni.

Živali iz katere koli satelitske skupine, za katero so načrtovana nadaljnja opazovanja, je treba ohranjati še nadaljnjih 28 dni brez tretiranja, da bi se odkrilo okrevanje ali obstojnost strupenih učinkov. Čas izpostavljenosti naj bo šest ur na dan.

Preskusno snov je treba nanesti enakomerno na območje, ki znaša približno 10 % celotne telesne površine. V primeru zelo strupene snovi je lahko površina pokritosti manjša, vendar mora kljub temu biti v celoti pokrita s čim tanjšo in čim bolj enakomerno plastjo.

V času izpostavljenosti se preskusna snov ohranja v stiku s kožo s porozno obvezo iz gaze in lepilnim trakom, ki ne draži kože. Preskusno območje je treba še dodatno pokriti na primeren način, da se obvezo iz gaze in preskusno snov obdrži na mestu ter zagotovi, da živali ne morejo zaužiti preskusne snovi. Za preprečitev zaužitja preskusne snovi je mogoče uporabiti opremo, ki omejuje gibanje živali, vendar pa popolna imobilizacija ni priporočljiva metoda.

Na koncu obdobja izpostavljenosti se, kjer je mogoče, odstrani ostanke preskusne snovi z vodo ali s kakšno drugo ustrezno metodo čiščenja kože.

Vse živali je treba dnevno opazovati in beležiti znake strupenosti vključno s časom njihovega nastopa, stopnjo in trajanjem. Opazovanje v kletkah naj vključuje opazovanje sprememb na koži in krznu, v očeh in sluznicah ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba meriti porabo hrane in živali vsak teden stehtati. Redno opazovanje živali je potrebno, da se zagotovi, da med preskusom ne pride do izgube živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napačne postavitve. Na koncu preskusnega obdobja se na vseh preživelih živalih iz nesatelitske preskusne skupine opravi nekropsija. Umirajoče živali je treba odstraniti in opraviti nekropsijo takoj, ko je to opaženo.

Naslednji pregledi se običajno opravijo na vseh živalih, vključno s kontrolnimi skupinami:

(a) Oftalmološki pregled z uporabo oftalmoskopa ali podobne ustrezne opreme je treba opraviti pred dajanjem preskusne snovi in ob zaključku študije, po možnosti na vseh živalih, najmanj pa na skupinah z visokim odmerkom in kontrolnih skupinah. Če se odkrijejo spremembe v očeh, je treba pregledati vse živali.

(b) Hematološko preiskavo, vključno s hematokritom, koncentracijo hemoglobina, številom eritrocitov, skupnim in diferencialnim številom levkocitov ter merjenjem zmožnosti koagulacije, kot je čas koagulacije, protrombinski čas, tromboplastinski čas ali število trombocitov, je treba opraviti na koncu preskusnega obdobja.

▼B

(c) Klinično biokemijsko določitev na krvi je treba izvesti na koncu preskusnega obdobja. Preskusna področja, ki štejejo za ustrezna vsem študijam, so ravnovesje elektrolitov, presnova ogljikovih hidratov, delovanje jeter in ledvic. Izbor določenih preskusov bo odvisen od opazovanj načina delovanja snovi. Predlagane določitve so meritve kalcija, fosforja, klora, natrija, kalija, glukoze na tešče (z obdobjem teščosti, ustreznim za posamezno vrsto), serumske glutaminske piruvične transaminaze ([1]), serumske glutaminske oksaloacetat transaminaze ([2]), ornitin-dekarboksilaze, gama-glutamil-transpeptidaze, sečnine, albumina, kreatinina v krvi, skupnega bilirubina in skupnih serumskih proteinov. Druge določitve, ki bi lahko bile potrebne za ustrezno oceno strupenosti vključujejo analize lipidov, hormonov, kislinsko-bazično ravnovesje, methemoglobina in aktivnost holinesteraze. Po potrebi je mogoče opraviti dodatne klinično biokemijske preiskave, da bi se razširilo raziskavo opaženih učinkov.

(d) Analize urina ni treba opravljati rutinsko, ampak samo takrat, kadar gre za indikacije, ki temeljijo na pričakovani ali opaženi strupenosti.

Če so predhodni podatki normalnih vrednosti neustrezni, je treba pozornost usmeriti na hematološke in klinično biokemijske parametre pred začetkom dajanja odmerkov.

1.6.6 Makroskopska nekropsija

Na vseh živalih je treba opraviti temeljito makroskopsko nekropsijo, ki vključujejo pregled zunanje površine telesa, vseh telesnih odprtin ter lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Jetra, ledvice, nadledvične žleze in moda je treba čim prej po seciranju, še vlažne, stehtati, da se izognemo izsušitvi. Naslednje organe in tkiva je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitne nadaljnje histopatološke preiskave: vse vidne lezije, možgane – vključno z deli podaljšane hrbtenjače/mosta, skorjo malih možganov in možgansko skorjo, hipofizo, ščitnico/obščitnico in tkivo priželjca, (sapnik), pljuča, srce, aorto, žleze slinavke, jetra, vranico, ledvice, nadledvične žleze, trebušno slinavko, spolne žleze, maternico, pomožne spolne organe, žolčnik (če je prisoten), požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, sečni mehur, reprezentativni limfni vozel, (mlečno žlezo samic), (stegensko mišičevje), periferni živec, (oči), (prsnico s kostnim mozgom), (stegnenica, vključno s površino sklepa), (hrbtenjačo na treh ravneh – vratni, prsni in ledveni) in (eksorbitalne žlezne solznice). Tkiva, navedena v oklepajih, je treba pregledati le, če kažejo znake strupenosti ali če gre za indikacijo, da so to ciljni organi.

1.6.7 Histopatološka preiskava

(a) Popolno histopatološko preiskavo je treba opraviti na normalni in tretirani koži ter organih in tkivih živali v kontrolni skupini in skupini z visokim odmerkom.

(b) Pregledati je treba vse vidne lezije.

([1]) Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza

▼B

(c) Pregledati je treba ciljne organe v skupinah z drugimi odmerki.

(d) Kadar so uporabljene podgane, je treba na pljučih živali iz skupin z nižjimi in srednje velikimi odmerki opraviti histopatološko preiskavo, da bi se odkrili znaki okužbe, saj se tako lahko ustrezno oceni zdravstveno stanje živali. Nadaljnje histopatološke preiskave na živalih v teh skupinah verjetno ne bodo potrebne na rutinski osnovi, vedno pa se morajo opraviti na organih, ki pokažejo znake lezij v skupini z visokim odmerkom.

(e) Kadar je uporabljena satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so v preskusnih skupinah opazni učinki.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opažene lezije, tipe lezij, in odstotek živali, ki kažejo določen tip lezije. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

— preskusni pogoji,

— velikosti odmerka (vključno z nosilcem, če je ta uporabljen) in koncentracije,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku,

— če je možno, velikost odmerka, pri kateri ni opaženega učinka,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,

— opis strupenih ali drugih učinkov,

— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o hrani in telesni masi,

— oftalmološke ugotovitve,

— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,

— opravljeni klinični biokemijski preskusi in vsi rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),

— ugotovitve nekropsije,

▼B

— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je to mogoče,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 OCENA IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

▼M4

B.29 SUBKRONIČNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU: 90-DNEVNA ŠTUDIJA

POVZETEK

Ta revidirana preskusna metoda B.29 je bila zasnovana za celovito opredelitev strupenosti preskusne kemikalije pri vdihavanju v subkroničnem obdobju (90 dni) in zagotavljanje podatkov za kvantitativne ocene tveganja pri vdihavanju. Skupine 10 samcev in 10 samic glodavcev se 90 dni (13 tednov) po 6 ur na dan izpostavljajo a) trem ali več različnim koncentracijam preskusne kemikalije, b) filtriranemu zraku (negativna kontrola) in/ali c) nosilcu (kontrola z nosilcem). Navadno se živali izpostavljajo 5 dni na teden, dovoljeno pa je tudi izpostavljanje 7 dni na teden. Vedno se preskušajo samci in samice, vendar se lahko izpostavljajo različnim koncentracijam, če je znano, da je en spol občutljivejši za določeno preskusno kemikalijo. Ta metoda vodji študije omogoča prožnost za vključitev satelitskih skupin (skupin za reverzibilnost), vmesnih žrtvovanj, bronhoalveolarne lavaže (BAL), nevroloških preskusov ter dodatnih kliničnih patoloških in histopatoloških ocen, da se bolje opredeli strupenost preskusne kemikalije.

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD 413 (2009). Prvotna smernica za preskušanje 413 v zvezi s subkronično strupenostjo pri vdihavanju (TG 413) je bila sprejeta leta 1981 (1). Ta preskusna metoda B.29 (ki ustreza revidirani TG 413 (2009)) je bila posodobljena, da upošteva trenutno stanje v znanosti ter izpolnjuje sedanje in prihodnje zakonodajne potrebe.

2. Študije subkronične strupenosti pri vdihavanju se uporabljajo predvsem za določanje zakonsko predpisanih koncentracij za ocenjevanje tveganj za delavce v delovnem okolju. Uporabljajo se tudi za ocenjevanje tveganj za ljudi v njihovem bivalnem okolju in med prevozom ter okoljskih tveganj. Ta metoda omogoča opredelitev škodljivih učinkov po ponavljajoči se dnevni izpostavljenosti preskusni kemikaliji z vdihavanjem, pri čemer preskušanje traja 90 dni (približno 10 % življenjske dobe podgane). Podatki, pridobljeni s študijami subkronične strupenosti pri vdihavanju se lahko uporabijo za kvantitativne ocene tveganja in izbiro koncentracij za študije kronične strupenosti. Ta preskusna metoda ni posebej namenjena preskušanju nanomaterialov. Pojmi, ki se uporabljajo v okviru te preskusne metode, so opredeljeni na koncu tega poglavja in v Dokumentu s smernicami (GD) št. 39 (2).

ZAČETNI PREUDARKI

3. Da se poveča kakovost študije in kar najbolj zmanjša uporaba živali, mora preskuševalni laboratorij pred izvedbo študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji. Informacije, ki pomagajo pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij, lahko vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah ter podatke, pridobljene z drugimi študijami s ponavljajočo se izpostavljenostjo. Če se med študijo pričakuje ali opazi nevrotoksičnost, se lahko vodja študije odloči vključiti ustrezne ocene, kot sta sklop funkcionalnih opazovanj (FOB) in merjenje motorične aktivnosti. Čeprav je lahko čas izpostavitve odločilen za posebne preglede, izvajanje teh dodatnih dejavnosti ne sme posegati v osnovno zasnovo študije.

▼M4

4. Razredčine jedkih ali dražilnih preskusnih kemikalij se lahko preskušajo pri koncentracijah, ki bodo zagotovile želeno stopnjo strupenosti. Več informacij je na voljo v GD 39 (2). Pri izpostavljanju živali tem snovem morajo biti ciljne koncentracije dovolj nizke, da ne povzročijo očitnih bolečin in trpljenja, vendar zadostne za razširitev krivulje koncentracija-odziv na ravni, ki izpolnjuje zakonodajni in znanstveni cilj preskusa. Te koncentracije je treba izbrati za vsak primer posebej, po možnosti na podlagi ustrezno zasnovane študije za ugotavljanje območja, s katero se pridobijo informacije o kritičnih končnih točkah, morebitnem pragu draženja in času nastopa (glej odstavke 11–13). Izbrane koncentracije je treba utemeljiti.

5. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo bolečine ali kažejo znake hudega in trajnega trpljenja, je treba humano usmrtiti. Umirajoče živali se upoštevajo enako kot tiste, ki so poginile med preskusom. Merila za sprejetje odločitve o usmrtitvi umirajočih živali ali živali, ki zelo trpijo, in napotki za prepoznavanje predvidljive ali neizbežne smrti so obravnavani v Dokumentu s smernicami OECD o humanih končnih točkah (3).

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

6. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle glodavce običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Najprimernejša vrsta je podgana, uporabo drugih vrst je treba utemeljiti.

Priprava živali

7. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje. Na dan randomizacije morajo biti živali mladi odrasli primerki, ki so stari 7 do 9 tednov. Njihova telesna teža ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže za vsak spol. Živali se naključno izberejo, označijo za posamično prepoznavanje in so pred začetkom preskusa najmanj 5 dni v kletkah, da se prilagodijo laboratorijskim razmeram.

Oskrba živali

8. Živali je treba posamično identificirati, po možnosti s podkožnimi transponderji, da se olajšajo opazovanja in prepreči zmeda. Temperatura v prostoru za oskrbo preskusnih živali mora biti 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, čeprav to morda ne bo mogoče, kadar se kot nosilec uporablja voda. Pred izpostavljanjem in po njem morajo biti živali v kletkah na splošno združene v skupine po spolu in koncentraciji, pri čemer število primerkov na kletko ne sme vplivati na neovirano opazovanje posamezne živali ter mora kar najbolj zmanjšati izgube zaradi kanibalizma in spopadov. Kadar bo izpostavljen samo nos živali, jih bo morda treba privajati na zadrževalne cevi. Te živalim ne smejo povzročati prevelikega fizičnega ali toplotnega stresa ali stresa zaradi imobilizacije. Omejevanje gibanja lahko vpliva na fiziološke končne točke, kot sta telesna temperatura (hipertermija) in/ali minutni dihalni volumen. Če so na voljo splošni podatki, ki kažejo, da se takih sprememb ne pojavi zelo veliko, predhodno prilagajanje zadrževalnim cevem ni potrebno. Živali, ki se izpostavijo aerosolu s celim telesom, morajo biti med izpostavljenostjo nastanjene posamično, da preskusnega aerosola ne morejo filtrirati preko kožuhov drugih primerkov v kletki. Razen med izpostavljenostjo se lahko uporablja običajna in potrjena laboratorijska hrana, ki jo spremlja neomejena količina pitne vode iz komunalnega omrežja. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe/12 ur teme.

▼M4

Inhalacijske komore

9. Pri izbiri inhalacijske komore je treba upoštevati lastnosti preskusne kemikalije in cilj preskusa. Po možnosti se kot način izpostavljenosti uporabi izpostavljenost nosu (imenovana tudi izpostavljenost glave ali smrčka). Izpostavljenost nosu je navadno najprimernejša za študije tekočih ali trdnih aerosolov ter za hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole. Mogoče je, da bo posebne cilje študije lažje doseči z izpostavljenostjo celega telesa, vendar je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. Kadar se uporablja komora za izpostavljenost celega telesa, skupni volumen preskusnih živali ne sme presegati 5 % prostornine komore, da se zagotovi stabilnost atmosfere. Načela tehnik izpostavljanja nosu in celega telesa ter njune prednosti in pomanjkljivosti so obravnavani v GD 39 (2).

ŠTUDIJE STRUPENOSTI

Mejne koncentracije

10. V nasprotju s študijami akutne strupenosti, za študije subkronične strupenosti pri vdihavanju ni opredeljenih mejnih koncentracij. Pri določanju najvišje koncentracije, ki bo preskušena, je treba upoštevati: 1. najvišjo dosegljivo koncentracijo, 2. stopnjo izpostavljenosti ljudi „v najslabšem primeru“, 3. dobrobitjo živali. Če ni mej, ki temeljijo na podatkih, se lahko uporabijo meje za akutno strupenost iz Uredbe (ES) št. 1272/2008 (13) (tj. do najvišje koncentracije 5 mg/l za aerosole, 20 mg/l za hlape in 20 000 ppm za pline) (glej GD 39 (2)). Če je treba pri preskušanju plinov ali lahko hlapnih preskusnih kemikalij (npr. hladil) te meje preseči, je to treba utemeljiti. Mejna koncentracija mora povzročiti nedvomno strupenost, ne da bi živalim povzročila nepotrebni stres ali vplivala na njihovo življenjsko dobo (3).

Študija za ugotavljanje območja

11. Pred začetkom glavne študije je navadno treba opraviti študijo za ugotavljanje območja. Ta je obsežnejša od opazovalne študije, saj ni omejena z izbiro koncentracij. Spoznanja, pridobljena v njej, lahko zagotovijo uspešnost glavne študije. S študijo za ugotavljanje območja se lahko na primer zagotovijo tehnične informacije o analitskih metodah, določanju velikosti delcev in odkrivanju mehanizmov strupenosti, klinični patološki in histopatološki podatki ter ocene, kolikšne so lahko koncentracije NOAEL in MTC v glavni študiji. Vodja študije se lahko študijo za ugotavljanje območja odloči uporabiti za določitev pragu draženja dihal (npr. s histopatološko preiskavo dihal, preskusom pljučne funkcije ali bronhoalveolarno lavažo), zgornje koncentracije, ki jo živali prenesejo brez nepotrebnega stresa, in parametrov, s katerimi bo mogoče najbolje opredeliti strupenost preskusne kemikalije.

12. Študija za ugotavljanje območja lahko zajema eno ali več koncentracij. Glede na izbrane končne točke je treba vsaki koncentraciji izpostaviti tri do šest samcev in tri do šest samic. Študija za ugotavljanje območja mora trajati vsaj 5 dni in navadno največ 28 dni. V poročilu o študiji je treba utemeljiti izbrane koncentracije za glavno študijo. Cilj glavne študije je dokazati razmerje koncentracija-odziv na podlagi pričakovanja o tem, katera bo najobčutljivejša končna točka. Nizka koncentracija mora biti po možnosti koncentracija brez opaznih škodljivih učinkov, medtem ko mora visoka koncentracija povzročiti nedvomno strupenost, ne da bi živalim povzročila nepotrebni stres ali vplivala na njihovo življenjsko dobo (3).

▼M4

13. Pri izbiri koncentracij za študijo za ugotavljanje območja je treba upoštevati vse razpoložljive informacije, vključno z razmerji struktura-aktivnost in podatki o podobnih kemikalijah (glej odstavek 3). S študijo za ugotavljanje območja se lahko potrdijo/zavrnejo pričakovanja o najobčutljivejših končnih točkah po mehanističnih merilih, npr. o inhibiciji holinesteraze z organofosfati, nastajanju methemoglobina zaradi eritrocitotoksičnih snovi, ščitničnih hormonih (T_3, T_4) v primeru tirotoksičnih snovi ter o beljakovinah, LDH ali nevtrofilcih pri bronhoalveolarni lavaži v primeru neškodljivih slabo topnih delcev ali aerosolov, ki dražijo pljuča.

Glavna študija

14. Glavna študija subkronične strupenosti običajno zajema tri različne koncentracije ter po potrebi tudi sočasno negativno kontrolo (z zrakom) in/ali kontrolo z nosilcem (glej odstavek 18). Pri izbiri primernih stopenj izpostavljenosti si je treba pomagati z vsemi razpoložljivimi podatki, vključno z rezultati študij sistemske strupenosti, presnovo in kinetiko (poseben poudarek je treba nameniti izogibanju visokim koncentracijam, ki nasitijo kinetične procese). Vsaka preskusna skupina vsebuje 10 samcev in 10 samic glodavcev, ki se 13 tednov (skupno študija traja vsaj 90 dni) po 5 dni na teden 6 ur na dan izpostavljajo preskusni kemikaliji. Živali se lahko izpostavljajo tudi 7 dni na teden (npr. pri preskušanju farmacevtskih izdelkov, ki se vdihavajo). Če je znano, da je en spol občutljivejši na določeno preskusno kemikalijo, se lahko spola izpostavljata različnim koncentracijam, da se zagotovi optimalen odziv na koncentracijo, kot je opisano v odstavku 15. Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljša obdobja izpostavljenosti prilagodijo, da se kar najbolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Kadar se uporabi obdobje izpostavljenosti, krajše od 6 ur/dan, ali kadar je treba opraviti študijo izpostavljenosti celega telesa z dolgimi obdobji (npr. 22 ur/dan), je treba to utemeljiti (glej GD 39 (2)). V obdobju izpostavljenosti je treba živalim odrekati hrano, razen če je to obdobje daljše od 6 ur. Med izpostavljenostjo celega telesa lahko živali ves čas uživajo vodo.

15. Z izbranimi ciljnimi koncentracijami je treba opredeliti ciljne organe in prikazati jasen odziv na koncentracijo:

— visoka koncentracija mora imeti strupene učinke, vendar ne sme povzročiti dolgotrajnih znakov ali smrtnosti, ki bi preprečili smiselno oceno,

— vmesne koncentracije morajo biti razporejene tako, da se doseže stopnjevanje med strupenimi učinki nizke in visoke koncentracije,

— nizka koncentracija mora povzročiti šibke znake strupenosti oziroma takih znakov ne sme povzročiti.

Vmesna žrtvovanja

16. Če se načrtujejo vmesna žrtvovanja, je treba število živali pri vsaki stopnji izpostavljenosti povečati za toliko, kolikor se jih namerava žrtvovati pred zaključkom študije. Uporabo vmesnih žrtvovanj je treba utemeljiti in žrtvovane živali ustrezno upoštevati v statističnih analizah.

▼M4

Satelitska študija (študija reverzibilnosti)

17. Satelitska študija (študija reverzibilnosti) se lahko uporabi za opazovanje reverzibilnosti, obstojnosti ali zapoznelega nastopa zastrupitve v ustrezno dolgem obdobju po tretiranju, ki pa ne sme bili krajše od 14 dni. Satelitske skupine (skupine za reverzibilnost) so sestavljene iz 10 samcev in 10 samic, ki se izpostavijo sočasno s preskusnimi živalmi v glavni študiji. Skupine za satelitsko študijo (študijo reverzibilnosti) je treba preskusni kemikaliji izpostaviti pri najvišji koncentraciji, pri čemer se po potrebi uporabi sočasna kontrola z zrakom in/ali kontrola z nosilcem (glej odstavek 18).

Kontrolne živali

18. Z živalmi za sočasno negativno kontrolo (z zrakom) je treba ravnati enako kot z živalmi v preskusni skupini, le da se namesto preskusni kemikaliji izpostavijo filtriranemu zraku. Kadar se za pomoč pri ustvarjanju preskusne atmosfere uporabi voda ali druga snov, je treba v študijo namesto negativne kontrolne skupine (z zrakom) vključiti kontrolno skupino z nosilcem. Če je le mogoče, je treba kot nosilec uporabiti vodo. Kadar se kot nosilec uporabi voda, morajo biti kontrolne živali izpostavljene zraku z enako relativno vlažnostjo kot pri preskusnih skupinah. Izbira ustreznega nosilca mora temeljiti na primerno izvedeni predhodni študiji ali preteklih podatkih. Če o strupenosti nosilca ni veliko znanega, se lahko vodja študije odloči uporabiti negativno kontrolo (z zrakom) in kontrolo z nosilcem, vendar se to močno odsvetuje. Kadar pretekli podatki razkrijejo, da nosilec ni strupen, negativna kontrolna skupina (z zrakom) ni potrebna in je treba uporabiti samo kontrolo z nosilcem. Če predhodna študija preskusne kemikalije, formulirane v nosilcu, ne pokaže strupenosti, iz tega sledi, da nosilec ni strupen pri preskušeni koncentraciji, tako da je treba uporabiti to kontrolo z nosilcem.

POGOJI IZPOSTAVLJENOSTI

Dajanje koncentracij

19. Živali se izpostavijo preskusni kemikaliji v obliki plina, hlapov, aerosola ali njihovih zmesi. Agregatno stanje, ki bo preskušeno, je odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, izbranih koncentracij in/ali fizikalne oblike, ki bo najverjetnejša med ravnanjem s preskusno kemikalijo in njeno uporabo. Higroskopne in kemično reaktivne preskusne kemikalije je treba preskušati v suhem ozračju. Paziti je treba, da se ne ustvarijo eksplozivne koncentracije. Za snovi, ki jih tvorijo delci, se lahko zaradi zmanjšanja velikosti delcev uporabijo mehanski postopki. Več napotkov je na voljo v GD 39 (2).

Porazdelitev velikosti delcev

20. Za vse aerosole in hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole, je treba določiti velikost delcev. Da se omogoči izpostavljenost vseh ustreznih predelov dihal, so priporočeni aerosoli, katerih mediana porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) znaša 1–3 μm z geometričnim standardnim odklonom (σ_g) 1,5–3,0 (4). Prizadevanje za izpolnitev tega standarda naj bo razumno; če ga ni mogoče izpolniti, je treba zagotoviti strokovno presojo. Delci kovinskih hlapov so na primer manjši od tega standarda, naelektreni delci in vlakna pa lahko presegajo navedene vrednosti.

▼M4

Priprava preskusne kemikalije v nosilcu

21. Preskusno kemikalijo je treba po možnosti preskušati brez nosilca. Če je uporaba nosilca nujna za ustvarjanje primerne koncentracije in velikosti delcev preskusne kemikalije, je treba prednostno uporabiti vodo. Vedno, kadar se preskusna kemikalija raztopi v nosilcu, je treba dokazati njeno stabilnost.

SPREMLJANJE POGOJEV IZPOSTAVLJENOSTI

Pretok zraka v komori

22. Pretok zraka skozi komoro za izpostavljanje je treba med vsako izpostavljenostjo skrbno nadzorovati, stalno spremljati in zabeležiti najmanj vsako uro. Sprotno spremljanje koncentracije (ali časovne stabilnosti) preskusne atmosfere je meritev, ki je neločljivo povezana z vsemi dinamičnimi parametri in zagotavlja posredno sredstvo za nadzor nad vsemi pomembnimi dinamičnimi parametri vdihavanja. Če se koncentracija spremlja sproti, se lahko pogostnost merjenja pretoka zraka zmanjša na eno meritev na izpostavljenost na dan. Pri komorah za izpostavljanje nosu je treba posebno pozornost nameniti preprečevanju ponovnega vdihavanja. Koncentracija kisika mora znašati najmanj 19 %, koncentracija ogljikovega dioksida pa ne sme presegati 1 %. Če obstaja razlog za domnevo, da tega standarda ni mogoče izpolniti, je treba koncentraciji kisika in ogljikovega dioksida izmeriti. Če meritve prvi dan izpostavljenosti pokažejo, da sta ravni teh plinov ustrezni, nadaljnje merjenje ni potrebno.

Temperatura in relativna vlažnost v komori

23. Temperaturo v komori je treba ohranjati pri 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost v območju dihanja živali je treba pri izpostavljenosti nosu in izpostavljenosti celega telesa stalno spremljati ter jo med vsako izpostavljenostjo vsako uro zabeležiti, kadar je to mogoče. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, vendar je to lahko bodisi nedosegljivo (npr. pri preskušanju zmesi na vodni osnovi) bodisi neizmerljivo zaradi interference preskusne kemikalije s preskusno metodo.

Preskusna kemikalija: nazivna koncentracija

24. Vedno, kadar je to izvedljivo, je treba izračunati in zabeležiti nazivno koncentracijo v komori za izpostavljanje. Nazivna koncentracija je masa ustvarjene preskusne kemikalije, deljena s skupnim volumnom zraka, ki preide skozi sistem inhalacijske komore. Nazivna koncentracija se ne uporablja za opredeljevanje izpostavljenosti živali, pač pa pri primerjavi z dejansko koncentracijo nakaže, kako učinkovito je ustvarjanje preskusnega sistema, in se torej lahko uporabi za odkrivanje težav pri ustvarjanju.

Preskusna kemikalija: dejanska koncentracija

25. Dejanska koncentracija je koncentracija preskusne kemikalije, vzorčena v območju dihanja živali v inhalacijski komori. Dejanske koncentracije se merijo s specifičnimi metodami (npr. z neposrednim vzorčenjem, adsorpcijskimi ali kemičnimi reaktivnimi metodami in naknadnim analitskim opredeljevanjem) ali nespecifičnimi metodami, kot je gravimetrična analiza s filtriranjem. Uporaba gravimetrične analize je sprejemljiva samo za enokomponentne prašne aerosole ali aerosole tekočin z majhno hlapnostjo ter jo je treba pred študijo podpreti z ustreznimi opredelitvami, specifičnimi za

▼M4

preskusno kemikalijo. Z gravimetrično analizo se lahko določi tudi koncentracija večkomponentnega prašnega aerosola, vendar so za to potrebni analitski podatki, ki kažejo, da je sestava snovi v zraku podobna začetni snovi. Če te informacije niso na voljo, bo morda treba med študijo znova analizirati preskusno kemikalijo (po možnosti takrat, ko lebdi v zraku) v rednih intervalih. Za aerosolizirane snovi, ki lahko izhlapijo ali sublimirajo, je treba prikazati, da so bile vse faze zbrane z izbrano metodo.

26. Po možnosti je treba v celotni študiji uporabljati eno serijo preskusne kemikalije, preskusni vzorec pa je treba hraniti v pogojih, v katerih se ohranjajo njegova čistost, homogenost in stabilnost. Pred začetkom študije je treba opredeliti lastnosti preskusne kemikalije, vključno z njeno čistostjo ter, če je to tehnično izvedljivo, identiteto in količinami ugotovljenih kontaminantov in nečistot. To se lahko med drugim prikaže z naslednjimi podatki: z retencijskim časom in relativno površino vrha, molekulsko maso, ugotovljeno na podlagi analiz z masno spektroskopijo ali plinsko kromatografijo, ali z drugimi ocenami. Čeprav identiteta preskusnega vzorca ni odgovornost preskuševalnega laboratorija, je morda smotrno, da ta vsaj v omejenem obsegu potrdi naročnikovo opredelitev lastnosti (npr. barvo, agregatno stanje itd.).

27. Atmosfera v komori za izpostavljanje mora biti konstantna, kolikor je to izvedljivo. Za dokazovanje stabilnosti pogojev izpostavljenosti se lahko uporabi naprava za sprotno spremljanje, kot je aerosolni fotometer za aerosole ali analizator skupnih ogljikovodikov za hlape. Dejansko koncentracijo v komori je treba izmeriti najmanj trikrat vsak dan izpostavljenosti za vsako stopnjo izpostavljenosti. Če to zaradi omejenih stopenj pretoka zraka ali nizkih koncentracij ni izvedljivo, zadostuje, da se v vsakem obdobju izpostavljenosti vzame le en vzorec. V tem primeru se vzorec po možnosti zbira prek celotnega obdobja izpostavljenosti. Posamezni vzorci koncentracije v komori lahko od srednje koncentracije v komori odstopajo za največ ± 10 % za pline in hlape oziroma za največ ± 20 % za tekoče ali trdne aerosole. Izračunati in zabeležiti je treba čas do vzpostavitve ravnotežja v komori (t_{95}). Čas izpostavljenosti pokriva čas ustvarjanja preskusne kemikalije. Pri tem sta upoštevana čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja v komori (t_{95}), in čas padanja. Napotki za ocenjevanje t_{95} so na voljo v GD 39 (2).

28. Pri zelo kompleksnih zmeseh, sestavljenih iz plinov/hlapov in aerosolov (npr. zgorevalnih atmosfer in preskusnih kemikalij, potiskanih iz namenskih proizvodov/naprav za posebno uporabo), se lahko v inhalacijski komori vsaka faza obnaša drugače. Zato je treba za vsako fazo (plin/hlape in aerosol) izbrati najmanj eno indikatorsko snov (analit), po navadi glavno aktivno sestavino v zmesi. Kadar je preskusna kemikalija zmes, je treba analitsko koncentracijo navesti za celotno zmes in ne le za aktivno sestavino ali indikatorsko snov (analit). Dodatne informacije o dejanskih koncentracijah so na voljo v GD 39 (2).

Preskusna kemikalija: porazdelitev velikosti delcev

29. Porazdelitev velikosti delcev aerosolov je treba določiti najmanj vsak teden za vsako koncentracijo s kaskadnim impaktorjem ali nadomestnim instrumentom, kot je aerodinamični merilnik delcev (APS). Če je mogoče prikazati enakovrednost rezultatov, dobljenih s kaskadnim impaktorjem in nadomestnim instrumentom, se lahko nadomestni instrument uporablja skozi celotno študijo.

▼M4

30. Vzporedno s primarnim instrumentom je treba za potrditev njegove učinkovitosti zbiranja uporabljati še drugo napravo, kot je gravimetrični filter ali (plinska) izpiralka. Masna koncentracija, dobljena z analizo velikosti delcev, mora biti v razumnih mejah masne koncentracije, dobljene z analizo s filtriranjem (glej GD 39 (2)). Če je enakovrednost pri vseh preskušenih koncentracijah mogoče prikazati zgodaj v študiji, se lahko nadaljnje potrditvene meritve opustijo. Zaradi dobrobiti živali je treba sprejeti ukrepe, s katerimi se kar najbolj zmanjša količina pomanjkljivih podatkov, zaradi katerih bi bilo treba študijo ponoviti.

31. Velikost delcev za hlape je treba določiti, če je mogoče, da se bodo hlapi kondenzirali v aerosol, ali če se v atmosferi s hlapi, v kateri so mogoče mešane faze, zaznajo delci.

OPAZOVANJA

32. Živali je treba klinično opazovati pred obdobjem izpostavljenosti ter med njim in po njem. Pogostejša opazovanja so lahko indicirana glede na odziv živali med izpostavljenostjo. Kadar opazovanje živali ovirajo uporaba zadrževalnih cevi za živali, slabo osvetljene komore za izpostavljanje celega telesa ali motne atmosfere, je treba živali pozorno opazovati po izpostavljenosti. Z opazovanji živali, preden so te izpostavljene naslednjega dne, je mogoče oceniti reverzibilnost ali okrepitev strupenih učinkov.

33. Vsa opažanja se sistematično zabeležijo, pri čemer se evidence vodijo za vsako žival posebej. Kadar se živali usmrtijo iz humanih razlogov ali so najdene poginule, je treba čas smrti navesti čim natančneje.

34. Opazovanja v kletkah morajo vključevati spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznicah, v dihalih, obtočilih in živčevju ter pri somatomotoričnih aktivnostih in vedenjskih vzorcih. Pozorno je treba opazovati tremorje, krče, slinjenje, drisko, letargijo, spanje in komo. Z merjenjem rektalne temperature se lahko pridobijo podporni dokazi o refleksni bradipneji ali hipo-/hipertermiji, povezani s tretiranjem ali konfinacijo. V protokol študije se lahko vključijo dodatne ocene, kot so kinetika, biomonitoring, pljučna funkcija, zadrževanje slabo topnih snovi, ki se kopičijo v pljučnem tkivu, in vedenjske spremembe.

TELESNA TEŽA

35. Težo posameznih živali je treba zabeležiti malo pred prvo izpostavljenostjo (dan 0), zatem pa dvakrat na teden (na primer ob petkih in ponedeljkih, da se prikaže okrevanje čez konec tedna, ko se živali ne izpostavljajo, ali na podlagi časovnega intervala, da se omogoči ocena sistemske strupenosti) ter ob poginu ali evtanaziji. Če v prvih 4 tednih ni učinkov, se lahko do konca študije telesna teža meri tedensko. Živali v satelitski skupini (skupini za reverzibilnost), če se uporabljajo, je treba tedensko tehtati prek celotnega obdobja okrevanja. Ob koncu študije je treba malo pred žrtvovanjem vse živali stehtati, da se omogoči nepristranski izračun razmerij med težo organov in telesno težo.

PORABA HRANE IN VODE

36. Porabo hrane je treba meriti tedensko. Meri se lahko tudi poraba vode.

▼M4

KLINIČNA PATOLOGIJA

37. Klinične patološke ocene je treba opraviti za vse živali, vključno s tistimi v kontrolnih skupinah in satelitski skupini (skupini za reverzibilnost), ko se žrtvujejo. Navesti je treba časovni interval med koncem izpostavljenosti in jemanjem krvi, zlasti kadar se obravnavana končna točka hitro vrne v prvotno stanje. Vzorčenje po koncu izpostavljenosti je indicirano za tiste parametre, ki imajo kratko plazemsko razpolovno dobo (npr. COHb, CHE in MetHb).

38. V preglednici 1 so našteti klinični patološki parametri, ki se navadno zahtevajo za vse toksikološke študije. Analiza urina se ne zahteva redno, vendar se lahko opravi, kadar se zdi koristna na podlagi pričakovane ali opažene strupenosti. Vodja študije se lahko za boljšo opredelitev strupenosti preskusne kemikalije odloči oceniti dodatne parametre (npr. holinesterazo, lipide, hormone, kislinsko-bazno ravnovesje, methemoglobin ali Heinzeva telesca, kreatin-kinazo, razmerje med mieloidnimi in eritroidnimi celicami, troponine, pline v arterijski krvi, laktat-dehidrogenazo, sorbital-dehidrogenazo ter γ-glutamiltranspeptidazo).

Preglednica 1

Standardni klinični patološki parametri

Hematologija	
število eritrocitov	skupno število levkocitov
hematokrit	diferencialno število levkocitov
koncentracija hemoglobina	število trombocitov
povprečna količina hemoglobina v eritrocitih	zmožnost koagulacije (izberite eno):
povprečni volumen eritrocitov	— protrombinski čas
povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih	— čas koagulacije
retikulociti	— parcialni tromboplastinski čas

Klinična kemija	
glukoza (*)	alanin-aminotransferaza
skupni holesterol	aspartat-aminotransferaza
trigliceridi	alkalna fosfataza
sečninski dušik v krvi	kalij
skupni bilirubin	natrij
kreatinin	kalcij
skupne beljakovine	fosfor
albumin	klorid
globulin	

Analiza urina (ni obvezno)	
videz (barva in motnost)	skupne beljakovine
količina	glukoza
specifična teža ali osmolalnost	kri/krvne celice
pH	

(*) Ker lahko dolgotrajno obdobje postenja vpliva na meritve glukoze pri tretiranih živalih glede na kontrolne živali, mora vodja študije odločiti, ali je živali primerno postiti. Če se uporabi obdobje postenja, mora to ustrezati uporabljeni živalski vrsti; za podgane lahko traja 16 h (postenje čez noč). Določanje glukoze na tešče se lahko izvede po postenju čez noč v zadnjem tednu izpostavljenosti ali po postenju čez noč pred obdukcijo (v zadnjem primeru skupaj z vsemi drugimi kliničnimi patološkimi parametri).

▼**M4**

39. Kadar obstajajo dokazi, da je spodnji del dihalnih poti (tj. alveole) primarno mesto odlaganja in retencije, je lahko bronhoalveolarna lavaža (BAL) najprimernejša tehnika za kvantitativno analizo na hipotezi temelječih parametrov razmerij med odmerkom in učinkom s poudarkom na alveolitisu, vnetju pljuč in fosfolipidozi. Tako je mogoče ustrezno preiskati spremembe v odzivu na odmerek in časovnem poteku alveolarne okvare. Bronhoalveolarni izpirek se lahko uporabi za analizo skupnega in diferencialnega števila levkocitov, skupnih beljakovin ter laktat-dehidrogenaze. Drugi parametri, ki se lahko obravnavajo, so tisti, ki nakazujejo lizosomske poškodbe, fosfolipidozo, fibrozo in dražilno ali alergijsko vnetje – pri slednjem se lahko vključi določitev vnetnih citokinov/kemokinov. Meritve BAL navadno dopolnjujejo rezultate histopatoloških preiskav, ne morejo pa jih nadomestiti. Napotki o tem, kako opraviti lavažo pljuč, so na voljo v GD 39 (2).

OFTALMOLOŠKE PREISKAVE

40. Z oftalmoskopom ali enakovredno napravo je treba opraviti oftalmološke preiskave očesnega ozadja, optičnih medijev, šarenice in veznice, in sicer pred dajanjem preskusne kemikalije na vseh živalih ter ob prenehanju tretiranja na vseh skupinah, tretiranih z visoko koncentracijo, in kontrolnih skupinah. Če se v očeh zaznajo spremembe, je treba pregledati tudi vse živali iz drugih skupin, vključno s satelitsko skupino (skupino za reverzibilnost).

MAKROSKOPSKA PATOLOGIJA IN TEŽA ORGANOV

41. Vse preskusne živali, vključno s tistimi, ki med preskusom poginejo ali so odstranjene iz študije zaradi njihove dobrobiti, je treba popolnoma eksangvinirati (če je to izvedljivo) in na njih opraviti makroskopsko obdukcijo. Navesti je treba čas med koncem zadnje izpostavljenosti vsake živali in njenim žrtvovanjem. Če obdukcije ni mogoče opraviti nemudoma po odkritju poginule živali, jo je treba ohladiti (ne zamrzniti) na dovolj nizko temperaturo, da se avtoliza kar najbolj zmanjša. Obdukcije je treba opraviti takoj, ko je mogoče, navadno v dnevu ali dveh. Za vsako žival je treba zabeležiti vse makroskopske patološke spremembe s posebnim poudarkom na spremembah dihal.

42. V preglednici 2 so našteti organi in tkiva, ki jih je treba med makroskopsko obdukcijo shraniti v ustreznem mediju za histopatološke preiskave. O shranjevanju organov in tkiv [v oglatih oklepajih] ter vseh drugih organov in tkiv odloča vodja študije. Z organov **v krepki pisavi** je treba odstraniti priraščena tkiva in navedene organe stehtati čim prej po disekciji, da se ne izsušijo. Ščitnico in nadmodek je treba stehtati samo, če je to potrebno, ker lahko ostanki obrezovanja ogrozijo histopatološko oceno. Tkiva in organe je treba takoj po obdukciji in najmanj 24–48 ur (odvisno od uporabljenega fiksativa) pred obrezovanjem fiksirati v 10-odstotnem puferiranem formalinu ali drugem ustreznem fiksativu.

▼M4

Preglednica 2

Organi in tkiva, ki se shranijo med makroskopsko obdukcijo

nadledvične žleze	požiralnik
aorta	[vohalni betič]
kostni mozeg (in/ali svež punktat)	**jajčniki**
možgani (vključno z rezinami velikih in malih možganov ter podaljšane hrbtenjače/mosta)	trebušna slinavka
	obščitnice
slepo črevo	periferni živec (ishiadični ali tibialni, po možnosti v bližini mišice)
debelo črevo	
dvanajsternik	hipofiza
[nadmodek]	prostata
[oči (mrežnica, vidni živec) in veke]	rektum
stegnenica in kolenski sklep	žleze slinavke
žolčnik (če je)	semenski mešički
[Harderjeve žleze]	koža
srce	hrbtenjača (vratni, prsni in ledveni del)
vito črevo	**vranica**
tešče črevo	prsnica
ledvice	želodec
[solzne žleze (zunaj očesne votline)]	zobje
grlo (3 ravni, vključno s spodnjim delom poklopca)	**moda**
jetra	**priželjc**
pljuča (vsi režnji na eni ravni, vključno z glavnima sapnicama)	**ščitnica**
	[jezik]
Hilusne bezgavke, zlasti za slabo topne preskusne kemikalije, ki jih tvorijo delci. Za bolj poglobljene preiskave in/ali študije z imunološkim poudarkom se lahko razmisli o dodatnih bezgavkah, npr. iz medpljučnega, vratnega/podčeljustnega in/ali ušesnega predela.	sapnik (vsaj 2 ravni, ki vključujeta 1 vzdolžni prerez skozi karino in 1 prečni prerez)
	[sečevod]
bezgavke (oddaljene od vstopnega mesta)	[sečnica]
mlečna žleza (samičina)	sečni mehur
mišica (stegenska)	**maternica**
nazofaringealna tkiva (vsaj 4 ravni, 1 raven naj vključuje nazofaringealni vod in z nosom povezano limfatično tkivo (NALT))	ciljni organi
	vse vidne lezije in skupki tkiv

▼M4

43. Pljuča je treba odstraniti nepoškodovana, jih stehtati in napolniti z ustreznim fiksativom pri tlaku 20–30 cm vode, da se ohrani njihova struktura (5). Rezine je treba zbrati za vse režnje na eni ravni, vključno z glavnima sapnicama, če pa se opravi lavaža pljuč, je treba iz neizpranega režnja vzeti rezine na treh ravneh (ki niso zaporedne).

44. Pregledati je treba najmanj 4 ravni nazofaringealnih tkiv, od katerih mora ena vključevati nazofaringealni vod (5) (6) (7) (8) (9), da se omogoči ustrezna preiskava ploščatega, prehodnega (neciliarnega respiratornega), respiratornega (ciliarnega respiratornega) in vohalnega epitelija, ter drenažno limfatično tkivo (NALT) (10) (11). Preiskati je treba tri ravni grla, od katerih mora ena vključevati spodnji del poklopca (12). Pregledati je treba vsaj dve ravni sapnika, kar vključuje en vzdolžni prerez skozi karino razcepišča glavnih sapnic in en prečni prerez.

HISTOPATOLOGIJA

45. Histopatološko oceno vseh organov in tkiv iz preglednice 2 je treba opraviti pri kontrolni skupini in skupini, tretirani z visoko koncentracijo, ter pri vseh živalih, ki poginejo ali so žrtvovane med študijo. Posebno pozornost je treba nameniti dihalom, ciljnim organom in vidnim lezijam. Organe in tkiva, ki imajo lezije v skupini, tretirani z visoko koncentracijo, je treba pregledati v vseh skupinah. Vodja študije se lahko odloči izvesti histopatološke ocene za dodatne skupine, da se prikaže jasen odziv na koncentracijo. Če se uporablja satelitska skupina (skupina za reverzibilnost), je treba opraviti histopatološko oceno za vsa tkiva in organe, na katerih so bili opaženi učinki v tretiranih skupinah. Če se v skupini, izpostavljeni visoki koncentraciji, pojavijo čezmerno število zgodnjih smrti ali druge težave, ki ogrožajo pomen podatkov, je treba skupino, tretirano z najbližjo nižjo koncentracijo, histopatološko pregledati. Makroskopska opažanja in mikroskopske ugotovitve je treba poskusiti povezati.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

46. Za posamezne živali je treba navesti podatke o telesni teži, porabi hrane, klinični patologiji, makroskopski patologiji, teži organov in histopatologiji. Podatke o kliničnih opažanjih je treba povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navedejo število uporabljenih živali, število živali, ki kažejo specifične znake zastrupitve, število živali, ki so bile najdene poginule med preskusom ali usmrčene iz humanih razlogov, čas smrti posameznih živali, opis in časovni potek strupenih učinkov in reverzibilnosti ter ugotovitve obdukcije. Vse rezultate, kvantitativne in naključne, je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabi se lahko katera koli splošno priznana statistična metoda, izbrati pa jo je treba med zasnovo študije.

Poročilo o preskusu

47. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije, kot je primerno:

Preskusne živali in oskrba

— opis pogojev v kletkah, vključno s številom (ali spremembo števila) živali na kletko, nastiljem, temperaturo in relativno vlažnostjo prostora, fotoperiodo ter opredelitvijo hrane,

▼M4

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev uporabe vrste, ki ni podgana. Podatki o izvoru in preteklosti se lahko navedejo, če se nanašajo na živali, za katere so bili uporabljeni podobni pogoji izpostavljenosti, nastanitveni pogoji in pogoji postenja,

— število, starost in spol živali,

— metodo randomizacije,

— opis morebitne priprave živali pred preskusom, vključno s hrano, karanteno in zdravljenjem.

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (vključno z izomerizacijo),

— identifikacijske podatke in registrsko številko Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), če je znana.

Nosilec

— utemeljitev uporabe nosilca in utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda),

— pretekle ali vzporedno pridobljene podatke, ki dokazujejo, da nosilec ne vpliva na rezultat študije.

Inhalacijska komora

— podroben opis inhalacijske komore, vključno s prostornino in diagramom,

— izvor in opis opreme, uporabljene za izpostavljanje živali in ustvarjanje atmosfere,

— opremo za merjenje temperature, vlažnosti, velikosti delcev in dejanske koncentracije,

— vir zraka in uporabljeni sistem za klimatiziranje,

— metode, uporabljene za umerjanje opreme za zagotavljanje homogene preskusne atmosfere,

— razliko v tlaku (pozitivno ali negativno),

— izpostavitvene odprtine na komoro (izpostavljanje nosu); položaj živali v komori (izpostavljanje celega telesa),

— stabilnost preskusne atmosfere,

— položaj tipal za zaznavanje temperature in vlažnosti ter mesto vzorčenja preskusne atmosfere v komori,

— obdelavo dovajanega/odvajanega zraka,

— stopnje pretoka zraka, stopnjo pretoka zraka/izpostavitveno odprtino (izpostavljanje nosu) ali število živali/komoro (izpostavljanje celega telesa),

— čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja v inhalacijski komori (t_{95}),

— število zamenjav volumnov zraka na uro,

— merilne naprave (če se uporabljajo).

Podatki o izpostavljenosti

— utemeljitev izbire ciljne koncentracije v glavni študiji,

▼M4

— nazivne koncentracije (skupna masa ustvarjene preskusne kemikalije v inhalacijski komori, deljena z volumnom zraka, ki preide skozi komoro),

— dejanske koncentracije preskusne kemikalije, ki se vzamejo v območju dihanja živali; za zmesi, pri katerih nastajajo heterogene fizikalne oblike (plini, hlapi, aerosoli), se lahko vsaka analizira ločeno,

— vse koncentracije v zraku je treba navesti v masnih enotah (mg/l, mg/m^3 itd.), in ne v prostorninskih enotah (ppm, ppb itd.),

— porazdelitev velikosti delcev, mediano porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) in geometrični standardni odklon (σg), vključno z metodami za njihov izračun. Poročati je treba o posameznih analizah velikosti delcev.

Preskusni pogoji

— podatke o pripravi preskusne kemikalije, vključno s podrobnostmi o postopkih, uporabljenih za zmanjšanje velikosti delcev trdnih snovi ali pripravo raztopin preskusne kemikalije,

— opis (ki po možnosti vključuje diagram) opreme, uporabljene za ustvarjanje preskusne atmosfere in izpostavljanje živali preskusni atmosferi,

— podatke o opremi, uporabljeni za spremljanje temperature, vlažnosti in pretoka zraka v komori (tj. pripravo umeritvene krivulje),

— podatke o opremi, uporabljeni za jemanje vzorcev za določanje koncentracije in porazdelitve velikosti delcev v komori,

— podatke o uporabljeni kemijski analitski metodi in njeni validaciji (vključno z rekuperacijo preskusne kemikalije iz nosilca za vzorčenje),

— metodo randomizacije pri dodeljevanju živali preskusnim in kontrolnim skupinam,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom hrane in virom vode),

— utemeljitev določitve preskusnih koncentracij.

Rezultati

— preglednice o temperaturi, vlažnosti in pretoku zraka v komori,

— preglednice s podatki o nazivnih in dejanskih koncentracijah v komori,

— preglednice s podatki o velikosti delcev, vključno s podatki o analitskem vzorčenju, porazdelitvijo velikosti delcev ter izračuni MMAD in σ_g,

— preglednice s podatki o odzivu in koncentracijo za vsako žival (tj. za živali, ki kažejo znake zastrupitve, vključno s smrtnostjo ter naravo, resnostjo, časom nastopa in trajanjem učinkov),

▼M4

— preglednice o teži posameznih živali,

— preglednice o porabi hrane,

— preglednice s kliničnimi patološkimi podatki,

— ugotovitve obdukcije in histopatološke ugotovitve za vsako žival, če so na voljo.

Razprava in razlaga rezultatov

— poseben poudarek je treba nameniti opisu metod, uporabljenih za izpolnitev meril te preskusne metode, npr. glede mejne koncentracije ali velikosti delcev,

— z vidika splošnih ugotovitev je treba obravnavati možnost vdihavanja delcev, zlasti če meril glede velikosti delcev ni bilo mogoče izpolniti,

— v splošno oceno študije je treba vključiti doslednost metod, uporabljenih za določanje nazivne in dejanske koncentracije, ter razmerje med njima,

— obravnavati je treba verjetni vzrok smrti in prevladujoči način delovanja (sistemski ali lokalni),

— če je bilo treba na podlagi meril iz Dokumenta s smernicami OECD o humanih končnih točkah (3) humano žrtvovati živali, ki so trpele bolečine ali kazale znake hudega in trajnega trpljenja, je treba to pojasniti,

— opredeliti je treba ciljne organe,

— določiti je treba vrednosti NOAEL in LOAEL.

VIRI:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Pariz.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

(4) Whalan, J. E. in Redden, J. C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth, D. L., Tyler, W. S., Plopper, C. E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (poglavje 9). V: Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H. P. in Brain, J. D. (ur.), Springer Verlag Heidelberg, str. 229–258.

(6) Young, J. T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

(7) Harkema, J. R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

(8) Woutersen, R. A., Garderen-Hoetmer, A., van Slootweg, P. J., Feron, V. J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. V: Waalkes, M. P. in Ward, J. M. (ur.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

(9) Mery, S., Gross, E. A., Joyner, D. R., Godo, M., Morgan, K. T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

(10) Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M. H., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Breda Vriesman van, P. J. C., Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

(11) Kuper, C. F., Arts, J. H. E., Feron, V. J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

(12) Lewis, D. J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

(13) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

B.30 ŠTUDIJE KRONIČNE STRUPENOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 452 (2009). Prvotna TG 452 je bila sprejeta leta 1981. Priprava te revidirane preskusne metode B.30 je bila ocenjena kot nujna zaradi upoštevanja nedavnega razvoja na področju dobrobiti živali in zakonodajnih zahtev (1) (2) (3) (4). Ta preskusna metoda B.30 je bila posodobljena vzporedno z revizijama poglavja B.32 te priloge z naslovom „Študije rakotvornosti“ in poglavja B.33 te priloge z naslovom „Kombinirane študije kronične strupenosti/rakotvornosti“, da bi se z uporabo živali v študiji pridobile dodatne informacije in da bi se zagotovilo več podatkov o izbiri odmerkov. Ta preskusna metoda je zasnovana za preskušanje zelo različnih kemikalij, vključno s pesticidi in industrijskimi kemikalijami.

2. Večina študij kronične strupenosti se opravi na glodavcih, zato je ta preskusna metoda namenjena zlasti uporabi v študijah, opravljenih na teh živalskih vrstah. Če bi bilo take študije treba izvesti na vrstah, ki niso glodavci, se lahko z ustreznimi prilagoditvami prav tako uporabijo načela in postopki, opisani v tej metodi, ter načela in postopki iz poglavja B.27 te priloge z naslovom „90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodavcih“ (5), kot je navedeno v Dokumentu s smernicami OECD št. 116 o zasnovi in izvajanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (6).

3. Glavni trije načini dajanja, ki se uporabljajo v študijah kronične strupenosti, so oralni, dermalni in inhalacijski. Izbira načina dajanja je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti preskusne kemikalije ter prevladujočega načina izpostavljenosti ljudi. Dodatne informacije o izbiri načina izpostavljenosti so na voljo v Dokumentu s smernicami OECD št. 116 (6).

4. Ta preskusna metoda je osredotočena na oralno izpostavljenost, ki se v študijah kronične strupenosti uporablja najpogosteje. Dolgoročne študije kronične strupenosti, ki vključujejo dermalno ali inhalacijsko izpostavljenost, so lahko prav tako potrebne za oceno tveganja za zdravje ljudi in/ali na podlagi nekaterih zakonodajnih ureditev, vendar pa sta oba navedena načina izpostavljenosti tehnično precej zapletena. Take študije je treba zasnovati za vsak primer posebej, je pa mogoče preskusno metodo za ocenjevanje in vrednotenje kronične strupenosti z oralnim načinom dajanja, opisano v tem dokumentu, uporabiti kot osnovo za protokol za inhalacijske in/ali dermalne študije, kar zadeva priporočila glede obdobij tretiranja, kliničnih in patoloških parametrov itd. Za inhalacijski (6) (7) in dermalni način dajanja (6) preskusnih kemikalij so na voljo napotki OECD. Pri zasnovi dolgoročnejših študij z inhalacijsko izpostavljenostjo je treba podrobno preučiti predvsem poglavji B.8 (8) in B.29 te priloge (9) ter Dokument s smernicami OECD o preskušanju akutne strupenosti pri vdihavanju (7). V primeru preskušanja z dermalnim načinom dajanja je treba upoštevati poglavje B.9 te priloge (10).

▼M4

5. S študijo kronične strupenosti se pridobivajo informacije o možnih nevarnostih za zdravje, ki se lahko pojavijo ob ponavljajoči se izpostavljenosti prek znatnega dela življenjske dobe uporabljene vrste. Z njo se pridobijo informacije o strupenih učinkih preskusne kemikalije ter nakažejo ciljni organi in možnost kopičenja. Poleg tega se lahko s študijo oceni vrednost brez opaženega škodljivega učinka, ki se lahko uporabi za določitev varnostnih meril za izpostavljenost ljudi. Poudarjena je tudi potreba po skrbnem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi kar največ informacij.

6. Cilji študij, na katere se nanaša ta preskusna metoda, vključujejo:

— opredelitev kronične strupenosti preskusne kemikalije,

— opredelitev ciljnih organov,

— opredelitev razmerja med odmerkom in odzivom,

— opredelitev vrednosti brez opaženega škodljivega učinka (NOAEL) ali izhodiščne točke za določitev primerjalnega odmerka (*benchmark dose* – BMD),

— napoved učinkov kronične strupenosti pri stopnjah izpostavljenosti ljudi,

— zagotovitev podatkov za preskušanje hipotez glede načina delovanja (6).

ZAČETNI PREUDARKI

7. Pri ocenjevanju in vrednotenju toksikoloških lastnosti preskusne kemikalije mora preskuševalni laboratorij pred izvedbo študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji, da se zasnova študije osredotoči na učinkovitejše preskušanje potenciala kronične strupenosti in da se kar najbolj zmanjša uporaba živali. Informacije, ki pomagajo pri zasnovi študije, vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; vse informacije o načinu delovanja; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR in toksikološke podatke o strukturno sorodnih snoveh; razpoložljive toksikokinetične podatke (podatke o kinetiki pri enkratnem odmerku in tudi pri ponavljajočih se odmerkih, če so na voljo) ter podatke, pridobljene z drugimi študijami s ponavljajočo se izpostavljenostjo. Kronično strupenost je treba ugotavljati šele po pridobitvi začetnih informacij o strupenosti na podlagi 28- in/ali 90-dnevnega preskusa strupenosti s ponavljajočimi se odmerki. V okviru splošne ocene potencialnih škodljivih učinkov določene preskusne kemikalije na zdravje je treba razmisliti o postopnem pristopu k preskušanju kronične strupenosti (11) (12) (13) (14).

8. Pred začetkom študije je treba določiti najprimernejše statistične metode za analizo rezultatov ob upoštevanju zasnove in ciljev preskusa. Med vidiki, ki jih je treba preučiti, je tudi vprašanje, ali bi morala statistika vključevati prilagoditev glede na preživetje in analizo v primeru predčasnega prenehanja tretiranja ene ali več skupin. Napotki o primernih statističnih analizah in ključne reference mednarodno priznanih statističnih metod so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (6) ter v Dokumentu s smernicami št. 35 o analizi in ocenjevanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (15).

▼M4

9. Pri izvajanju študije kronične strupenosti je treba vedno upoštevati vodilna načela in preudarke, opisane v Dokumentu s smernicami OECD št. 19 o prepoznavanju, ocenjevanju in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali pri oceni varnosti (16), zlasti odstavek 62 navedenega dokumenta. V tem odstavku je navedeno: „*Pri študijah, ki vključujejo ponavljajoče se odmerke, je treba sprejeti premišljeno odločitev, ali naj se žival humano usmrti ali ne, če kaže klinične znake, ki se stopnjujejo in vodijo v dodatno poslabšanje njenega stanja. Ta odločitev mora vključevati razmislek o vrednosti informacij, ki bodo pridobljene z ohranitvijo zadevne živali v študiji glede na njeno splošno stanje. Če se sprejme odločitev, da se žival ohrani v preskusu, je treba po potrebi povečati pogostnost opazovanj. Obstaja tudi možnost, da se brez ogrožanja namena preskusa začasno prekine dajanje odmerkov, če bi to ublažilo bolečine ali trpljenje, ali da se zmanjša preskusni odmerek.*“

10. Podrobni napotki in razprava o načelih izbire odmerkov za študije kronične strupenosti in rakotvornosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (6) ter v dveh publikacijah, ki ju je pripravil International Life Sciences Institute (17) (18). Osrednja strategija izbire odmerkov je odvisna od glavnega cilja ali ciljev študije (odstavek 6). Pri izbiri ustreznih velikosti odmerkov je treba najti ravnotežje med spremljanjem nevarnosti na eni ter opredeljevanjem učinkov majhnih odmerkov in njihovim pomenom na drugi strani. To je zlasti pomembno, kadar bo izvedena kombinirana študija kronične strupenosti in rakotvornosti (poglavje B.33 te priloge) (odstavek 11).

11. Razmisliti je treba o možnosti, da se namesto ločene izvedbe študije kronične strupenosti (ta preskusna metoda B.30) in študije rakotvornosti (poglavje B.32 te priloge) izvede kombinirana študija kronične strupenosti in rakotvornosti (poglavje B.33 te priloge). S kombiniranim preskusom se v primerjavi z izvedbo dveh ločenih študij zagotovi večja učinkovitost v smislu časa in stroškov, ne da bi bila pri tem ogrožena kakovost podatkov v fazi v zvezi s kronično strupenostjo ali v fazi v zvezi z rakotvornostjo. Vendar je treba pri izvajanju kombinirane študije kronične strupenosti in rakotvornosti (poglavje B.33 te priloge) skrbno upoštevati načela izbire odmerkov (odstavki 9 in 20–25), poleg tega pa se tudi priznava, da se na podlagi nekaterih zakonodajnih okvirov lahko zahteva ločena izvedba študij.

12. Pojmi, ki se uporabljajo v okviru te preskusne metode, so opredeljeni na koncu tega poglavja in v Dokumentu s smernicami št. 116 (6).

NAČELO PRESKUSA

13. Preskusna kemikalija se dnevno v stopnjevanih odmerkih daje več skupinam preskusnih živali, pri čemer preskus navadno traja 12 mesecev, čeprav se lahko glede na zakonodajne zahteve izberejo tudi daljša ali krajša obdobja (glej odstavek 33). Izbrano obdobje mora biti dovolj dolgo, da se lahko pokažejo učinki kumulativne strupenosti, ne pa tudi zavajajoči učinki sprememb, povezanih s staranjem. Odstopanja od 12-mesečnega obdobja izpostavljenosti je treba utemeljiti, zlasti krajša obdobja. Preskusna kemikalija se navadno daje oralno, čeprav je lahko primerno tudi preskušanje z inhalacijskim ali dermalnim načinom dajanja. Zasnova študije lahko vključuje tudi eno ali več vmesnih usmrtitev, npr. pri 3 ali 6 mesecih, zaradi česar se lahko vključijo dodatne skupine živali (glej odstavek 19). V obdobju dajanja odmerkov je treba pozorno opazovati, ali živali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in se na njih opravi obdukcija.

▼M4

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

14. Ta preskusna metoda je namenjena predvsem ocenjevanju in vrednotenju kronične strupenosti na glodavcih (glej odstavek 2), čeprav se priznava, da se lahko z nekaterimi zakonodajnimi ureditvami zahtevajo podobne študije na vrstah, ki niso glodavci. Izbiro živalske vrste je treba utemeljiti. Kadar se zahtevajo študije kronične strupenosti na vrstah, ki niso glodavci, morata zasnova in izvajanje takih študij morata temeljiti na načelih, opisanih v tej preskusni metodi, ter na tistih iz poglavja B.27 te priloge z naslovom „90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodavcih“ (5). Dodatne informacije o izbiri živalske vrste in seva so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (6).

15. V tej preskusni metodi je priporočena vrsta podgana, uporabijo pa se lahko tudi druge vrste glodavcev, npr. miš. Podgane in miši so najprimernejši preskusni modeli zaradi njihove razmeroma kratke življenjske dobe, razširjene uporabe v farmakoloških in toksikoloških študijah, občutljivosti za indukcijo tumorjev ter razpoložljivosti dovolj opredeljenih sevov. Zaradi teh lastnosti je na voljo veliko informacij o njihovi fiziologiji in patologiji. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. V študiji kronične strupenosti je treba uporabiti isti sev in izvor živali kot v predhodnih krajših študijah strupenosti. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje.

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

16. Živali se lahko nastanijo posamično ali dajo v kletke v manjših skupinah istega spola; posamična nastanitev se lahko predvidi samo, če je znanstveno utemeljena (19) (20) (21). Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora biti 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, mora biti cilj 50- do 60-odstotna vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Hrana mora zadovoljevati vse prehranske potrebe preskušane živalske vrste, vsebnost kontaminantov, med drugim ostankov pesticidov, obstojnih organskih onesnaževal, fitoestrogenov, težkih kovin in mikotoksinov, ki lahko vplivajo na rezultat preskusa, pa mora biti čim manjša. Redno je treba pripravljati analitske informacije o ravneh kontaminantov v hranilih in hrani, vsaj na začetku študije in kadar se zamenja serija uporabljane kemikalije, ter jih vključiti v končno poročilo. Prav tako je treba zagotoviti analitske informacije o pitni vodi, uporabljeni v študiji. Kadar se preskusna kemikalija daje s hrano, lahko na izbiro hrane vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije in zadovoljevanju prehranskih potreb živali.

Priprava živali

17. Uporabiti je treba zdrave živali, ki so se najmanj 7 dni prilagajale laboratorijskim razmeram in še niso bile vključene v preskusne postopke. V primeru glodavcev je treba odmerke začeti dajati čim prej po odstavitvi od sesanja in prilagajanju na okolje, po možnosti preden so živali stare 8 tednov. Opredeliti je treba vrsto, sev, izvor, spol, težo in starost preskusnih živali. Ob začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali za vsak spol čim manjše, njihova teža pa ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže vseh živali v študiji glede na spol. Živali se naključno

▼M4

dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Po randomizaciji med skupinami v okviru vsakega spola ne sme biti večjih razlik v povprečni telesni teži. Če obstajajo statistično pomembne razlike, je treba fazo randomizacije ponoviti, če je to mogoče. Vsaki živali je treba dodeliti edinstveno identifikacijsko številko in jo trajno označiti s to številko s tetovažo, vsaditvijo mikročipa ali drugo ustrezno metodo.

POSTOPEK

Število in spol živali

18. Uporabiti je treba oba spola. Število živali mora biti zadostno, da je ob koncu študije v vsaki skupini dovolj živali za temeljito biološko in statistično ocenjevanje. Pri glodavcih je treba običajno uporabiti najmanj 20 živali na spol za vsako velikost odmerka, medtem ko se pri vrstah, ki niso glodavci, priporočajo najmanj 4 živali na spol na skupino. V študijah, ki vključujejo miši, so lahko potrebne dodatne živali v vsaki odmerni skupini, da je mogoče opraviti vse zahtevane hematološke preiskave.

Uporaba vmesnih usmrtitev, satelitskih skupin in opozorilnih živali

19. Če je to znanstveno utemeljeno, se lahko v študiji predvidijo vmesne usmrtitve (vsaj 10 živali/spol/skupino), npr. pri 6 mesecih, da se zagotovijo informacije o napredovanju toksikoloških sprememb in mehanistične informacije. Kadar so take informacije že na voljo iz prejšnjih študij strupenosti s ponavljajočimi se odmerki v zvezi z zadevno preskusno kemikalijo, vmesne usmrtitve morda niso znanstveno utemeljene. Vključijo se lahko tudi satelitske skupine za spremljanje reverzibilnosti morebitnih toksikoloških sprememb, ki jih povzroči preiskovana preskusna kemikalija; te preiskave so navadno omejene na največji odmerek v študiji in kontrolo. Poleg tega se lahko po potrebi predvidi dodatna skupina opozorilnih živali (navadno 5 živali na spol) za spremljanje patološkega stanja med študijo (22). Če se načrtujejo vmesne usmrtitve ali vključitev satelitskih ali opozorilnih skupin, je treba število živali v zasnovi študije povečati za toliko, kolikor se jih namerava usmrtiti pred zaključkom študije. Za te živali so običajno potrebna enaka opazovanja kot za živali v fazi študije v zvezi s kronično strupenostjo, vključno s telesno težo, porabo hrane/vode, hematološkimi in kliničnimi biokemičnimi meritvami ter patološkimi preiskavami, čeprav se lahko predvidi tudi (za skupine za vmesno usmrtitev), da se meritve omejijo na specifična ključna merila, kot sta nevrotoksičnost ali imunotoksičnost.

Odmerne skupine in odmerjanje

20. Napotki glede vseh vidikov izbire odmerkov in razporeditve njihovih velikosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (6). Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in sočasno kontrolo, razen če se opravi mejni preskus (glej odstavek 27). Velikosti odmerkov navadno temeljijo na rezultatih kratkoročnejših študij s ponavljajočimi se odmerki ali študij za ugotavljanje območja, pri njihovem določanju pa je treba upoštevati vse obstoječe toksikološke in toksikokinetične podatke, ki so na voljo za preskusno kemikalijo ali sorodne snovi.

▼M4

21. Razen kadar zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ali bioloških učinkov preskusne kemikalije to ni mogoče, je navadno treba največjo velikost odmerka izbrati za opredelitev glavnih ciljnih organov in strupenih učinkov, pri čemer se je treba izogibati povzročanju trpljenja, hude zastrupitve, obolevnosti ali smrti. Ob upoštevanju dejavnikov, navedenih v odstavku 22 spodaj, je treba največji odmerek izbrati tako, da se izzovejo znaki strupenosti, na primer upočasnitev pridobivanja telesne teže (približno 10-odstotna).

22. Vendar se lahko glede na cilje študije (glej odstavek 6) izbere tudi največji odmerek, manjši od odmerka, ki povzroča znake zastrupitve, npr. če odmerek izzove škodljiv učinek, ki vzbuja zaskrbljenost, ne vpliva pa bistveno na življenjsko dobo ali telesno težo. Največji odmerek ne sme presegati 1 000 mg/kg telesne teže/dan (mejni odmerek, glej odstavek 27).

23. Velikosti odmerkov in razporeditev med njimi se lahko izberejo za določanje odziva v odvisnosti od odmerka in vrednosti NOAEL ali drugega želenega izida študije, npr. BMD (glej odstavek 25) pri najmanjšem odmerku. Dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določitvi manjših odmerkov, vključujejo pričakovani naklon krivulje odmerek-odziv, odmerke, pri katerih se lahko pojavijo pomembne spremembe v presnovi ali načinu strupenega delovanja, velikost, pri kateri se pričakuje prag, ali velikost, pri kateri se pričakuje izhodiščna točka za ekstrapolacijo majhnih odmerkov.

24. Izbrana razporeditev velikosti odmerkov je odvisna od lastnosti preskusne kemikalije in je v tej preskusni metodi ni mogoče predpisati, vendar dva- do štirikratni intervali velikokrat zagotovijo visoko učinkovitost preskusa, kadar se uporabijo za določitev padajočih velikosti odmerkov, namesto uporabe zelo velikih intervalov (npr. večjih od faktorja približno 6–10) med odmerki pa je pogosto primerneje dodati četrto preskusno skupino. Na splošno se je treba izogibati uporabi faktorjev, večjih od 10, če se uporabijo, pa je to treba utemeljiti.

25. Kot je nadalje navedeno v Dokumentu s smernicami št. 116 (6), je treba pri izbiri odmerkov upoštevati:

— znane ali domnevne nelinearnosti ali točke pregiba na krivulji odmerek-odziv,

— toksikokinetiko in odmerna območja, v katerih se pojavljajo ali ne pojavljajo presnovna indukcija, nasičenje ali nelinearnost med zunanjimi in notranjimi odmerki,

— prekurzorske lezije, označevalce učinka ali kazalnike delovanja ključnih temeljnih bioloških procesov,

— ključne (ali domnevne) vidike načina delovanja, kot so odmerki, pri katerih se začne pojavljati citotoksičnost, so ravni hormonov motene, homeostatični mehanizmi preobremenjeni itd.,

— predele krivulje odmerek-odziv, pri katerih je potrebna posebno zanesljiva ocena, npr. v območju pričakovanega BMD ali predvidenega praga,

— preudarke v zvezi s pričakovanimi stopnjami izpostavljenosti ljudi.

▼M4

26. Kontrolna skupina je netretirana skupina ali kontrolna skupina z nosilcem, če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja nosilec. Z živalmi v kontrolni skupini je treba ravnati enako kot z živalmi v preskusni skupini, le da se ne tretirajo s preskusno kemikalijo. Če se uporablja nosilec, mora kontrolna skupina prejeti največjo količino nosilca, ki je bila uporabljena med odmernimi skupinami. Če se preskusna snov daje s hrano in se s tem zaradi njene manjše okusnosti povzroči bistveno zmanjšanje vnosa hrane, je lahko koristna dodatna, po parih hranjena kontrolna skupina, ki se uporablja kot primernejša kontrola.

27. Če je mogoče na podlagi informacij iz predhodnih študij predvideti, da preskus pri eni velikosti odmerka, enakovredni najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, verjetno ne bo povzročil škodljivih učinkov, in če glede na podatke o strukturno sorodnih kemikalijah strupenost ni pričakovana, popolna študija s tremi velikostmi odmerkov morda ne bo potrebna. Lahko se uporabi meja 1 000 mg/kg telesne teže/dan, razen če izpostavljenost ljudi nakazuje potrebo po večjem odmerku.

Priprava odmerkov in dajanje preskusne kemikalije

28. Preskusna kemikalija se običajno daje oralno, s hrano ali pitno vodo oziroma z gavažo. Dodatne informacije o načinih in metodah dajanja so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (6). Način in metoda dajanja sta odvisna od namena študije, fizikalnih/kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, njene biološke dostopnosti ter prevladujočega načina in metode izpostavljenosti ljudi. Izbrani način in metodo dajanja je treba utemeljiti. Zaradi dobrobiti živali je treba oralno gavažo praviloma izbrati samo pri tistih snoveh, pri katerih sta ta način in metoda dajanja razumno reprezentativna za potencialno izpostavljenost ljudi (npr. pri farmacevtskih izdelkih). Prehranske in okoljske kemikalije, vključno s pesticidi, se navadno dajejo s hrano ali pitno vodo. V nekaterih scenarijih, npr. pri izpostavljenosti na delovnem mestu, pa so lahko primernejši drugi načini dajanja.

29. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Upoštevati je treba naslednje lastnosti nosilca in drugih aditivov, kot je ustrezno: učinke na absorpcijo, porazdelitev, presnovo ali retencijo preskusne kemikalije, učinke na kemijske lastnosti preskusne kemikalije, ki lahko spremenijo njene strupene lastnosti, ter učinke na porabo hrane ali vode ali na prehranjenost živali. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/emulzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih nosilcih. Pri nevodnih nosilcih morajo biti strupene lastnosti nosilca znane. Na voljo morajo biti informacije o stabilnosti preskusne kemikalije in homogenosti raztopin ali hrane, ki se bodo uporabljale v preskusu (kot je ustrezno), v pogojih dajanja (npr. s hrano).

30. Pri kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Pri dolgoročnih študijah strupenosti, pri katerih se uporablja dajanje s hrano, koncentracija preskusne kemikalije v hrani praviloma ne sme presegati zgornje meje 5 % vse hrane, da se preprečijo prehranska neravnovesja. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (mg/kg hrane ali ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali (mg/kg telesne teže), ki se izračuna vsak teden. Uporabljeni način je treba navesti.

▼M4

31. V primeru oralnega dajanja živali dobijo odmerek preskusne kemikalije vsak dan (sedem dni na teden), preskusno obdobje pa navadno traja 12 mesecev (glej tudi odstavek 33), čeprav so lahko glede na zakonodajne zahteve potrebna tudi daljša obdobja. Vsak drugačen režim odmerjanja, npr. pet dni na teden, je treba utemeljiti. V primeru dermalnega dajanja so živali s preskusno kemikalijo navadno tretirane vsaj 6 ur na dan 7 dni na teden, kot je navedeno v poglavju B.9 te priloge (10), prek obdobja 12 mesecev. Inhalacijska izpostavljenost se izvaja 6 ur na dan 7 dni na teden, uporabiti pa je mogoče tudi izpostavljenost 5 dni na teden, če je utemeljena. Obdobje izpostavljenosti praviloma traja 12 mesecev. Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljši časi izpostavljenosti prilagodijo, da se kar najbolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Obdobja izpostavljenosti, krajša od 6 ur na dan, je treba utemeljiti. Glej tudi poglavje B.8 te priloge (8).

32. Če se preskusna kemikalija živalim daje z gavažo, je treba pri tem uporabljati želodčno cevko ali ustrezno intubacijsko kanilo, postopek pa opravljati vsak dan ob podobnem času. Običajno živali dobijo enkraten odmerek enkrat na dan, če pa je kemikalija na primer lokalni dražljivec, se lahko dnevno odmerjena količina ohranja tudi z dajanjem polovičnih odmerkov (dvakrat na dan). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. To količino je treba ohranjati tako majhno, kot je praktično, praviloma pa pri glodavcih ne sme preseči 1 ml/100 g telesne teže (22). Spremenljivost preskusne količine je treba kar najbolj zmanjšati s prilagajanjem koncentracije, da se zagotovi konstantna količina pri vseh velikostih odmerkov. Izjema so potencialno jedke ali dražilne kemikalije, ki jih je treba razredčiti, da se preprečijo resni lokalni učinki. Preskušanju pri koncentracijah, pri katerih obstaja verjetnost jedkosti ali dražilnosti za prebavni trakt, se je treba izogibati.

Trajanje študije

33. Čeprav je ta preskusna metoda primarno zasnovana kot 12-mesečna študija kronične strupenosti, je zasnovana tako, da se lahko uporablja tudi za kratkoročnejše (npr. 6- ali 9-mesečne) ali dolgoročnejše (npr. 18- ali 24-mesečne) študije, glede na zahteve konkretnih zakonodajnih ureditev ali za posebne mehanistične namene. Odstopanja od 12-mesečnega obdobja izpostavljenosti je treba utemeljiti, zlasti krajša obdobja. Satelitske skupine, vključene za spremljanje reverzibilnosti toksikoloških sprememb, ki jih povzroči preiskovana preskusna kemikalija, se s preskusno kemikalijo ne tretirajo najmanj 4 tedne in največ eno tretjino celotnega trajanja študije po koncu izpostavljenosti. Več napotkov, vključno s preudarki o preživetju v študiji, je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (6).

OPAZOVANJA

34. Vse živali je treba pregledovati za odkrivanje obolevnosti ali smrtnosti, običajno na začetku in koncu vsakega dne, vključno s konci tedna in prazniki. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka, če gre za dajanje z gavažo.

▼M4

35. Podrobna klinična opazovanja je treba opraviti na vseh živalih vsaj enkrat pred prvo izpostavljenostjo (za omogočanje primerjav na istem osebku), ob koncu prvega tedna študije, zatem pa mesečno. Protokol za opazovanja je treba določiti tako, da so razlike med posameznimi opazovalci čim manjše in neodvisne od preskusne skupine. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj kletk, v katerih živali bivajo, po možnosti na standardnem mestu in vedno ob istem času. Opažanja je treba skrbno zabeležiti, po možnosti z uporabo sistemov točkovanja, ki jih izrecno določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da se pogoji opazovanja čim manj spreminjajo. Pozornost je med drugim treba nameniti vsem spremembam na koži, kožuhu, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenju, piloerekciji, velikosti zenic in nenavadnemu vzorcu dihanja). Prav tako je treba zabeležiti spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipij (npr. prekomernega čiščenja, ponavljajočega se vrtenja v krogu) ali nenormalnega vedenja (npr. samopohabe, vzvratne hoje) (24).

36. Na vseh živalih je treba pred prvim dajanjem preskusne kemikalije z oftalmoskopom ali drugo primerno opremo opraviti oftalmološko preiskavo. Ob koncu študije je treba to preiskavo po možnosti opraviti na vseh živalih, vsekakor pa vsaj pri skupini, tretirani z velikim odmerkom, in kontrolni skupini. Če se v očeh zaznajo spremembe, povezane s tretiranjem, je treba pregledati vse živali. Če strukturna analiza ali druge informacije kažejo na strupenost za oči, je treba pogostnost preiskav oči povečati.

37. Za kemikalije, v zvezi s katerimi je predhodni 28- in/ali 90-dnevni preskus strupenosti s ponavljajočimi se odmerki nakazal potencial za povzročanje nevrotoksičnih učinkov, se lahko po izbiri ocenijo senzorične reakcije na različne vrste dražljajev (24) (npr. slušne, vidne in proprioceptivne dražljaje) (25) (26) (27), moč oprijema (28) ter motorična aktivnost (29), in sicer pred začetkom študije ter vsake 3 mesece po začetku študije do 12. meseca in vključno z njim, pa tudi ob koncu študije (če je daljša od 12 mesecev). Nadaljnje podrobnosti glede možnih postopkov so na voljo v navedenih virih. Uporabiti je mogoče tudi druge postopke, ki v njih niso opisani.

38. Za kemikalije, v zvezi s katerimi je predhodni 28- in/ali 90-dnevni preskus strupenosti s ponavljajočimi se odmerki nakazal potencial za povzročanje imunotoksičnih učinkov, se lahko nadaljnje preiskave te končne točke po izbiri opravijo ob koncu študije.

Telesna teža, poraba hrane/vode in izkoristek hrane

39. Vse živali je treba stehtati na začetku tretiranja, vsaj enkrat na teden prvih 13 tednov, zatem pa najmanj enkrat na mesec. Meritve porabe in izkoristka hrane je treba prvih 13 tednov opravljati vsaj enkrat na teden, nato pa najmanj enkrat na mesec. Kadar se kemikalija daje s pitno vodo, je treba porabo vode prvih 13 tednov meriti vsaj enkrat na teden, zatem pa najmanj enkrat na mesec. O meritvah porabe vode je treba razmisliti tudi pri študijah, pri katerih se spremenijo vzorci pitja.

▼M4

Hematologija in klinična biokemija

40. V študijah z glodavci je treba hematološke preiskave opravljati na vsaj 10 samcih in 10 samicah na skupino, in sicer pri 3, 6 in 12 mesecih, pa tudi ob koncu študije (če je daljša od 12 mesecev), pri čemer je treba za te preiskave v vsej študiji uporabljati iste živali. Pri miših so lahko za izvedbo vseh zahtevanih hematoloških preiskav potrebne satelitske živali (glej odstavek 18). V študijah na vrstah, ki niso glodavci, se vzorci jemljejo manjšemu številu živali (npr. 4 živalim na spol na skupino v študijah s psi) ob vmesnih vzorčenjih in ob koncu študije, kot je opisano za glodavce. Meritve pri 3 mesecih, pa naj gre za študije z glodavci ali vrstami, ki niso glodavci, ni treba opraviti, če v predhodni 90-dnevni študiji, izvedeni s primerljivimi velikostmi odmerkov, niso bili opaženi učinki na hematološke parametre. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu, na primer s punkcijo srca ali iz retroorbitalnega sinusa, medtem ko je žival v anesteziji.

41. Preiskati je treba naslednji seznam parametrov (30): skupno in diferencialno število levkocitov, število eritrocitov, število trombocitov, koncentracijo hemoglobina, hematokrit (volumen stisnjenih eritrocitov), povprečni volumen eritrocitov (MCV), povprečno količino hemoglobina v eritrocitih (MCH), povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitih (MCHC), protrombinski čas in aktivirani parcialni tromboplastinski čas. Glede na strupenost preskusne kemikalije se lahko, kot je primerno, merijo tudi drugi hematološki parametri, kot so Heinzeva telesca ali druge netipične morfološke oblike eritrocitov ali methemoglobin. Na splošno je treba sprejeti prožni pristop glede na opažene in/ali pričakovane učinke dane preskusne kemikalije. Če preskusna kemikalija učinkuje na krvotvorni sistem, sta lahko indicirana tudi meritev števila retikulocitov in citološka preiskava kostnega mozga, čeprav teh ni treba izvajati redno.

42. Klinične biokemične preiskave za ugotavljanje glavnih strupenih učinkov na tkiva ter zlasti ledvice in jetra je treba opravljati na vzorcih krvi, odvzetih najmanj 10 samcem in 10 samicam na skupino v istih časovnih intervalih, kot so določeni za hematološke preiskave, ter pri tem prek celotne študije uporabljati iste živali. Pri miših so lahko za izvedbo vseh zahtevanih kliničnih biokemičnih preiskav potrebne satelitske živali. V študijah na vrstah, ki niso glodavci, se vzorci jemljejo manjšemu številu živali (npr. 4 živalim na spol na skupino v študijah s psi) ob vmesnih vzorčenjih in ob koncu študije, kot je opisano za glodavce. Meritev pri 3 mesecih, pa naj gre za študije z glodavci ali vrstami, ki niso glodavci, ni treba opraviti, če v predhodni 90-dnevni študiji, izvedeni s primerljivimi velikostmi odmerkov, niso bili opaženi učinki na klinične biokemične parametre. Pred odvzemom vzorcev krvi je priporočljivo živali čez noč postiti (kar pa ne velja za miši). Preiskati je treba naslednji seznam parametrov (30): glukozo, sečnino (sečninski dušik), kreatinin, skupne beljakovine, albumin, kalcij, natrij, kalij, skupni holesterol, najmanj dva ustrezna preskusa za hepatocelularno oceno (alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, glutamat-dehidrogenaza, skupne žolčne kisline) (31) in najmanj dva ustrezna preskusa za hepatobiliarno oceno (alkalna fosfataza, γ-glutamil transferaza, 5'-nukleotidaza, skupni bilirubin, skupne žolčne kisline) (31). Glede na strupenost preskusne kemikalije se lahko, kot je primerno, merijo tudi drugi klinični kemični parametri, kot so vrednost trigliceridov na tešče, specifični hormoni in holinesteraza. Na splošno je potreben prožni pristop glede na opažene in/ali pričakovane učinke dane preskusne kemikalije.

▼M4

43. Analize urina je treba opraviti na najmanj 10 samcih in 10 samicah na skupino na vzorcih, zbranih v istih časovnih intervalih kot pri hematoloških in kliničnih kemičnih preiskavah. Meritev pri 3 mesecih ni treba opraviti, če v predhodni 90-dnevni študiji, izvedeni s primerljivimi velikostmi odmerkov, niso bili opaženi učinki pri analizi urina. V strokovno priporočilo glede kliničnih patoloških študij (30) je bil vključen naslednji seznam parametrov: videz, količina, osmolalnost ali specifična teža, pH, skupne beljakovine in glukoza. Druge določitve vključujejo keton, urobilinogen, bilirubin in okultno kri. Če je treba preiskavo opaženih učinkov razširiti, se lahko uporabijo dodatni parametri.

44. Na splošno se šteje, da je treba izhodiščne hematološke in klinične biokemične spremenljivke določiti pred tretiranjem v študijah s psi, ne pa tudi v študijah z glodavci (30). Če pa so pretekli izhodiščni podatki (glej odstavek 50) nezadostni, je treba razmisliti o pripravi takih podatkov.

Patologija

Makroskopska obdukcija

45. Praviloma se na vseh živalih v študiji opravi popolna in natančna makroskopska obdukcija, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Lahko pa se tudi predvidi (za skupine za vmesno usmrtitev ali satelitske skupine), da se meritve omejijo na specifična ključna merila, kot sta nevrotoksičnost ali imunotoksičnost (glej odstavek 19). Obdukcija in poznejši postopki, opisani v naslednjih odstavkih, pri teh živalih niso potrebni. Za opozorilne živali je lahko obdukcija potrebna v posameznih primerih, o čemer odloča vodja študije.

46. Stehtati je treba organe vseh živali, razen tistih, ki se izključijo na podlagi zadnjega dela odstavka 45. Z nadledvičnih žlez, možganov, nadmodka, srca, ledvic, jeter, jajčnikov, vranice, mod, ščitnice (stehtane po fiksaciji skupaj z obščitnicami) in maternice vseh živali (razen živali, ki so bile najdene umirajoče in/ali so bile usmrčene med študijo) je treba, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato izmeriti njihovo mokro težo čim prej po disekciji, da se ne izsušijo. V študijah z mišmi tehtanje nadledvičnih žlez ni obvezno.

47. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo (32) (tkiva v oglatih oklepajih niso obvezna):

vse vidne lezije	srce	trebušna slinavka	želodec (predželodec, žlezni želodec)
nadledvična žleza	vito črevo	obščitnica	[zobje]
aorta	tešče črevo	periferni živec	modo
možgani (vključno z rezinami velikih in malih možganov ter podaljšane hrbtenjače/mosta)	ledvica	hipofiza	priželjc
slepo črevo	solzna žleza (zunaj očesne votline)	prostata	ščitnica
maternični vrat	jetra	rektum	[jezik]

▼M4

koagulacijska žleza	pljuča	žleza slinavka	sapnik
debelo črevo	bezgavke (povrhnje in globoke)	semenski mešiček	sečni mehur
dvanajsternik	mlečna žleza (obvezna za samice, in če jo je mogoče secirati s prostim očesom, za samce)	skeletna mišica	maternica (vključno z maternično vratom)
nadmodek	[zgornja dihala, vključno z nosom, nosnimi školjkami in obnosnimi votlinami]	koža	[sečevod]
oko (vključno z mrežnico)	požiralnik	hrbtenjača (na treh ravneh: vratni, prsni in ledveni)	[sečnica]
[stegnenica s sklepom]	[vohalni betič]	vranica	vagina
žolčnik (pri vrstah, ki niso podgane)	jajčnik	[prsnica]	rezina in/ali svež punktat kostnega mozga
Harderjeva žleza			

Pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba shraniti oba organa. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije. V študijah z dermalnim načinom dajanja je treba shraniti iste organe, kot so določeni na seznamu za oralni način, bistveno pa je posebno vzorčenje in shranjevanje kože z mesta nanosa. V inhalacijskih študijah je treba v zvezi s seznamom shranjenih in pregledanih tkiv dihal slediti priporočilom iz poglavij B.8 (8) in B.29 te priloge (9). Za druge organe/tkiva (in poleg posebej shranjenih tkiv dihal) je treba preučiti seznam organov, določen za oralni način dajanja.

Histopatologija

48. Na voljo so napotki o najboljših praksah pri izvajanju toksikoloških patoloških študij (32). Histopatološke preiskave morajo obsegati vsaj:

— vsa tkiva živali iz skupine, tretirane z velikim odmerkom, in kontrolne skupine,

— vsa tkiva živali, ki so poginile ali bile usmrčene med študijo,

— vsa tkiva, ki kažejo makroskopske abnormalnosti,

— ciljna tkiva ali tkiva, pri katerih so bile v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opažene s tretiranjem povezane spremembe, vseh živali iz vseh drugih odmernih skupin,

— pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba pregledati oba organa.

▼M4

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

49. Navesti je treba podatke za posamezne živali in za vse ocenjevane parametre. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navede število živali na začetku preskusa, število živali, ki so bile med preskusom najdene poginule ali so bile usmrčene iz humanih razlogov, in čas vsake smrti ali humane usmrtitve, število živali, ki kažejo znake zastrupitve, opis opaženih znakov zastrupitve, vključno s časom njihovega nastopa, trajanjem in resnostjo vseh strupenih učinkov, ter število živali, pri katerih so opažene lezije, vrste lezij in odstotek živali, pri katerih je opažena posamezna vrsta lezije. V preglednicah s povzetimi podatki je treba navesti srednje vrednosti in standardne odklone (za preskusne podatke, ki se nenehno zbirajo) za živali, pri katerih so opaženi strupeni učinki ali lezije, ter razvrstitev lezij.

50. Pretekli kontrolni podatki so lahko dragoceni za razlago rezultatov študije, npr. kadar obstajajo znaki, da podatki, zagotovljeni s sočasnimi kontrolami, bistveno odstopajo od nedavnih podatkov, pridobljenih na kontrolnih živalih iz istega preskuševalnega laboratorija/kolonije. Če se ocenjujejo pretekli kontrolni podatki, morajo izhajati iz istega laboratorija ter se nanašati na živali iste starosti in seva, poleg tega pa morajo biti pridobljeni v petih letih pred zadevno študijo.

51. Če je ustrezno, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Statistične metode in podatke, ki bodo analizirani, je treba izbrati pri zasnovi študije (odstavek 8). V izbiri je treba predvideti prilagoditve glede na preživetje, če so potrebne.

Poročilo o preskusu

52. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijske podatke,

— izvor kemikalije,

— številko serije,

— potrdilo o kemijski analizi.

Nosilec (če je ustrezno)

— utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda).

Preskusne živali

— uporabljeno vrsta/sev in utemeljitev izbire,

— število, starost in spol živali ob začetku preskusa,

▼M4

— izvor, nastanitvene pogoje, hrano itd.,

— težo vsake živali ob začetku preskusa.

Preskusni pogoji

— utemeljitev načina dajanja in izbire odmerkov,

— če je ustrezno, uporabljene statistične metode za analizo podatkov,

— podatke o formulaciji preskusne kemikalije/pripravi hrane,

— analitske podatke o doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka,

— način dajanja in podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— za inhalacijske študije informacijo, ali je bila uporabljena izpostavljenost nosu ali izpostavljenost celega telesa,

— dejanske odmerke (mg/kg telesne teže/dan) in faktor za pretvorbo koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (mg/kg ali ppm) v dejanski odmerek, če je ustrezno,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

Rezultati (predstaviti je treba povzete podatke v preglednicah in podatke za posamezne živali)

— podatke o preživetju,

— telesno težo/spremembe telesne teže,

— porabo hrane, izračune izkoristka hrane, če so bili narejeni, in porabo vode, če je ustrezno,

— podatke o toksični reakciji glede na spol in velikost odmerka, vključno z znaki zastrupitve,

— vrsto, pogostnost (in če se ocenjuje, resnost) in trajanje kliničnih opažanj (prehodnih ali trajnih),

— oftalmološko preiskavo,

— hematološke preskuse,

— klinične biokemične preskuse,

— analize urina,

— rezultat morebitnih preiskav nevrotoksičnosti ali imunotoksičnosti,

— terminalno telesno težo,

— težo organov (in razmerja med težami organov, če je ustrezno),

— izsledke obdukcije,

— podroben opis ugotovitev vseh s tretiranjem povezanih histopatoloških preiskav,

— podatke o absorpciji, če so na voljo.

▼**M4**

Statistična obdelava rezultatov, če je ustrezno

Razprava o rezultatih

— razmerja med odmerkom in odzivom,

— preučitev vseh informacij o načinu delovanja,

— razpravo o morebitnih pristopih modeliranja,

— določitev BMD, NOAEL ali LOAEL,

— pretekle kontrolne podatke,

— pomembnost za ljudi.

Sklepi.

VIRI:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rim, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Pariz.

(2) Combes, R. D., Gaunt, I., Balls, M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

(3) Barlow, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., idr. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

(4) Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

(5) Poglavje B.27 te priloge, Preskus subkronične oralne toksičnosti: 90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodalcih.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druga izdaja. Series on Testing and Assessment No. 116, na voljo na javni spletni strani OECD o smernicah za preskušanje na naslovu www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

(8) Poglavje B.8 te priloge, Subakutna strupenost pri vdihavanju: 28-dnevna študija.

(9) Poglavje B.29 te priloge, Subkronična strupenost pri vdihavanju: 90-dnevna študija.

(10) Poglavje B.9 te priloge, Strupenost (v stiku s kožo) pri ponavljajočem se odmerku (28 dni).

(11) Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R., idr. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

(12) Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T., idr. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

(13) Doe, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A., idr. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼M4

(14) Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M., idr. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Pariz.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

(17) Rhomberg, L. R., Baetcke, K., Blancato, J., Bus, J., Cohen, S., Conolly, R., Dixit, R., Doe, J., Ekelman, K., Fenner-Crisp, P., Harvey, P., Hattis, D., Jacobs, A., Jacobson-Kram, D., Lewandowski, T., Liteplo, R., Pelkonen, O., Rice, J., Somers, D., Turturro, A., West, W., Olin, S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran, J. A. (ur.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21: 15–23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

(26) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health 9: 691–704.

(27) Moser, V. C., McDaniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

(28) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

(29) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

▼**M4**

(30) Weingand, K., Brown, G., Hall, R., idr. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(31) (Osnutek) dokumenta agencije EMEA z naslovom „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman, J. W., Goodman, D. G., Hildebrandt, P. K., idr. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.;

▼B

B.31 ŠTUDIJA STRUPENOSTI ZA PREDROJSTVENI RAZVOJ

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 414 (2001).

1.1 UVOD

Metoda za preskušanje strupenosti za razvoj je namenjena zagotavljanju splošnih informacij o učinkih predrojstvene izpostavljenosti breje preskusne živali in razvijajočih se organizmov v maternici; to lahko vključuje oceno vplivov matere, pa tudi smrti, strukturnih anomalij ali spremenjene rasti zarodka. Funkcionalne pomanjkljivosti, čeprav pomemben del razvoja, niso sestavni del te preskusne metode. Lahko se preizkusijo v posebni študiji ali kot dodatek k tej študiji z uporabo preskusne metode za razvojno nevrotoksičnost. Za informacije o preskušanju funkcionalnih pomanjkljivosti in drugih poporodnih učinkov preskusne metode se lahko na primeren način uporabi študija dvogeneracijske reproduktivne strupenosti ali študija razvojne nevrotoksičnosti.

Pri tej preskusni metodi je lahko v posameznih primerih potrebna posebna prilagoditev na podlagi posebnega poznavanja npr. fizikalno-kemijskih ali toksikoloških lastnosti preskusne snovi. Taka prilagoditev je sprejemljiva, kadar prepričljivi znanstveni podatki kažejo, da bo prilagoditev omogočila bolj informativen preskus. V takem primeru je treba znanstvene podatke natančno dokumentirati v poročilu o študiji.

1.2 DEFINICIJE

Razvojna toksikologija: preučevanje škodljivih učinkov na razvoj organizma, ki so lahko posledica izpostavljenosti pred spočetjem, med razvojem pred rojstvom ali po rojstvu do spolne zrelosti. Glavne pojavne oblike strupenosti za razvoj vključujejo 1. smrt organizma, 2. strukturno anomalijo, 3. spremenjeno rast in 4. funkcionalno pomanjkljivost. Razvojno toksikologijo so v preteklosti pogosto imenovali teratologija.

Škodljivi učinek: vsako odstopanje od normalnega, povezano s tretiranjem, ki zmanjšuje sposobnost organizma za preživetje, razmnoževanje ali prilagoditev okolju. V razvojni toksikologiji v njenem najširšem pomenu vključuje vsak učinek, ki moti normalen razvoj zarodka pred rojstvom in po njem.

Spremenjena rast: sprememba mase ali velikosti organa ali telesa potomca.

Spremembe (nepravilnosti): strukturne spremembe v razvoju, ki vključujejo deformnosti in odstopanja (28).

Deformnost/večja anomalija: strukturna sprememba, ki naj bi bila za žival škodljiva (lahko tudi smrtna) in je navadno redka.

▼B

Odstopanje/manjša anomalija: strukturna sprememba, ki naj bi imela malo ali nič škodljivega učinka na žival; lahko je prehodna in lahko se razmeroma pogosto pojavlja v kontrolni populaciji.

Zarodek: vsota izpeljank oplojenega jajčeca v kateri koli stopnji razvoja od oploditve do rojstva, vključno z embrionalnimi membranami ter embriom ali fetusom.

Vgnezditev (nidacija): pritrditev blastociste v epitelno maternično sluznico, vključno s prediranjem skozi maternični epitelij in vsaditvijo v endometrij.

Embrio: zgodnja ali razvojna stopnja katerega koli organizma, zlasti razvojni produkt oplojenega jajčeca od takrat, ko se pojavi vzdolžna os, do takrat, ko nastanejo vse glavne strukture.

Embriotoksičnost: škodljivo za normalno strukturo, razvoj, rast in/ali sposobnost za preživetje embria.

Fetus: nerojeni potomec v postembrionalnem obdobju.

Fetalna toksičnost: škodljivo za normalno strukturo, razvoj, rast in/ali preživetje fetusa.

Splav: predčasna izločitev produktov spočetja iz maternice: embria ali fetusa, nezmožnega preživetja.

Resorpcija: zarodek, ki naknadno po vgnezditvi v maternici odmre in se resorbira.

Zgodnja resorpcija: dokaz o vgnezditvi brez prepoznavnega embria/fetusa.

Pozna resorpcija: mrtvi embrio ali fetus z zunanjimi degenerativnimi spremembami.

NOAEL: kratica za vrednost brez opaznih škodljivih učinkov (No Observed Adverse Effect Level) in je največji odmerek ali stopnja izpostavljenosti, pri kateri ne opazimo nobenega škodljivega učinka, povezanega s tretiranjem.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Navadno se preskusna snov daje brejim živalim najmanj od vgnezditve do enega dne pred dnevom predvidene usmrtitve, ki naj bo čim bliže normalnemu dnevu kotitve brez tveganja izgube podatkov, ki izhajajo iz predčasne kotitve. Preskusna metoda ni namenjena samo preučevanju obdobja organogeneze (npr. od 5 do 15 dne pri glodalcu in od 6 do 18 dne pri kuncu), temveč tudi učinkov pred vgnezditvijo, kadar je primerno, v vsem obdobju brej osti do dneva pred carskim rezom. Malo pred carskim rezom se samice usmrtijo, preuči se maternična vsebina, fetusi pa se ocenijo glede na zunanje vidne nepravilnosti in spremembe mehkega tkiva in okostja.

▼B

1.5 OPIS PRESKUSNE METODE

1.5.1 **Izbira živalskih vrst**

Priporoča se, da se preskušanje izvaja na najustreznejših vrstah in da se uporabijo laboratorijske vrste in sevi, ki se navadno uporabljajo pri preskušanju strupenosti za predrojstveni razvoj. Priporočena glodalska vrsta je podgana in priporočena neglodalska vrsta je kunec. Če se uporabi druga vrsta, je treba to utemeljiti.

1.5.2 **Nastanitvene in prehranjevalne razmere**

Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi naj bo 22 °C (± 3°) za glodalce in 18 °C (± 3+) za kunce. Čeprav naj bi bila relativna vlažnost najmanj 30 % in je zaželeno, da ne presega 70 %, razen v času čiščenja prostora, je cilj 50–60 %. Osvetlitev naj bo umetna, zaporedje 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Parjenje naj se izvaja v kletkah, ki so primerne za ta namen. Čeprav je priporočljiva individualna namestitev živali, ki se parijo, je sprejemljiva tudi skupinska namestitev v manjšem številu.

1.5.3 **Priprava živali**

Uporabiti je treba zdrave živali, ki so se najmanj pet dni prilagajale na laboratorijske razmere in predhodno niso bile uporabljene za poskuse. Poznati je treba vrsto, sev, vir, spol, maso in/ali starost poskusnih živali. Živali v vseh preskusnih skupinah naj bodo čim enotnejše po masi in starosti. Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti mlade odrasle samice, ki še niso kotile. Samice naj se parijo s samci iste vrste in seva, izogibati se je treba parjenju sorojencev. Pri glodalcih je dan brejosti 0 tisti dan, ko se opazi vaginalni čep in/ali seme; pri kuncih je dan 0 navadno dan koitusa ali umetne osemenitve, če se uporabi ta tehnika. Sparjene samice se na nepristranski način dodelijo v kontrolno in tretirano skupino. Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi pozicije kletk čim manjši. Vsaki živali se dodeli enotna identifikacijska številka. Sparjene samice se na nepristranski način dodelijo v kontrolno in tretirano skupino in če se samice parijo v serijah, se živali iz vsake serije enakomerno porazdelijo v skupini. Podobno se samice, ki jih osemeni isti samec, enakomerno porazdelijo v obe skupini.

1.6 POSTOPEK

1.6.1 **Število in spol živali**

Vsaka preskusna in kontrolna skupina naj vključuje zadostno število samic, tako da bo za obdukcijo približno 20 ženskih živali z vgnezditvijo. Skupine z manj kakor 16 živali z vgnezditvijo so lahko neustrezne. Ni nujno, da smrtnost mater ogrozi študijo, pod pogojem, da ni večja od približno 10 %.

▼B

1.6.2 **Priprava odmerkov**

Če se za olajšanje odmerjanja uporablja nosilec ali drug aditiv, je treba upoštevati naslednje lastnosti: učinke na absorpcijo, distribucijo, presnovo in retencijo ali ekskrecijo preskusne snovi; učinke na kemijske lastnosti preskusne snovi, ki lahko spremenijo njene toksične lastnosti; ter učinke na porabo hrane ali vode ali na prehranjenost živali. Nosilec ne sme biti toksičen za razvoj in ne sme učinkovati na reprodukcijo.

1.6.3 **Odmerjanje**

Normalno se preskusna snov daje vsak dan od vgnezditve (npr. od 5. dne po parjenju) do dneva pred predvidenim carskim rezom. Če predhodne študije, ki so na voljo, ne navajajo visoke možnosti za izgubo pred vgnezditvijo, se lahko tretiranje podaljša, tako da vključuje celotno obdobje brej osti, od parjenja do dneva pred predvideno usmrtitvijo. Dobro je znano, da se lahko neprimerno ravnanje ali stres med nosečnostjo končata s predrojstveno izgubo. Da bi zavarovali predrojstveno izgubo pred dejavniki, ki niso povezani s tretiranjem, se je treba izogibati nepotrebnemu pretovarjanju brejih živali, pa tudi stresu zaradi zunanjih dejavnikov, na primer hrupa.

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in hkratno kontrolo. Zdrave živali se na nepristranski način dodelijo v kontrolno in tretirano skupino. Velikost odmerkov se razporedi tako, da se toksični učinki stopnjujejo. Razen kadar to zaradi fizikalno-kemijske narave ali bioloških lastnosti preskusne snovi ni mogoče, je treba najvišjo vrednost odmerka izbrati tako, da povzroči nekaj toksičnosti za razvoj in/ali pri materi (klinični znaki ali zmanjšanje telesne mase), vendar ne smrt ali hudo trpljenje. Najmanj ena vmesna velikost odmerka mora povzročiti minimalno opazne toksične učinke. Najmanjša velikost odmerka ne sme povzročiti nobenega dokaza toksičnosti niti za razvoj niti pri materi. Padajoče zaporedje velikosti odmerkov je treba izbrati tako, da se pokažejo vse reakcije, ki so odvisne od odmerka, in vrednost brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL). Za padajoče zaporedje velikosti odmerkov so pogosto optimalni dvakratni do štirikratni intervali, pogosto pa je bolje dodati še dodatno četrto preskusno skupino, kakor uporabiti zelo velike intervale med odmerki (npr. več kakor faktor 10). Čeprav je cilj ugotoviti vrednost brez opaznih škodljivih učinkov pri materi, so lahko sprejemljive tudi študije, ki ne dokažejo take vrednosti (1).

Vrednosti odmerkov je treba izbirati ob upoštevanju vseh obstoječih podatkov o strupenosti, pa tudi dodatnih informacij o presnovi in toksikokinetiki preskusne snovi ali sorodnih materialov. Te informacije pomagajo tudi pri dokazovanju ustreznosti režima odmerjanja.

Uporabiti je treba hkratno kontrolno skupino. Ta skupina je kontrolna skupina, tretirana z nepravim nadomestkom ali kontrolna skupina, tretirana le z nosilcem, če je ta uporabljen pri dajanju preskusne snovi. Vsem skupinam se daje enaka količina bodisi preskusne snovi ali nosilca. Živali v kontrolni (h) skupini(ah) se obravnavajo na enak način kakor živali v preskusni skupini. Kontrolne skupine, tretirane z nosilcem, morajo prejeti količino nosilca, enako največji uporabljeni količini (kakor v najnižji tretirani skupini).

▼B

1.6.4 **Mejni preskus**

Če preskus pri eni velikosti odmerka najmanj 1 000 mg/kg telesne mase/dan z oralnim dajanjem, pri katerem se uporabijo postopki, opisani za to študijo, ne povzroči opazne toksičnosti pri nobeni breji živali ali njenih potomcih in če se glede na obstoječe podatke (npr. o strukturno in/ali presnovno sorodnih zmeseh) ne pričakuje učinka, potem se šteje, da ni potrebna popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov. Pričakovana človekova izpostavljenost lahko narekuje potrebo, da se v mejnem preskusu uporabi večji oralni odmerek. Pri drugih vrstah dajanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne snovi pogosto določajo in omejujejo največjo dosegljivo raven izpostavljenosti (na primer dermalna aplikacija ne bi smela povzročati hude lokalne toksičnosti).

1.6.5 **Dajanje odmerkov**

Preskusna snov ali nosilec se navadno daje oralno z intubacijo. Če se uporabi drug način dajanja odmerkov, mora izvajalec preskusa zagotoviti utemeljitev in razlog za svojo izbiro, lahko pa so potrebne ustrezne spremembe (2)(3)(4). Preskusno snov je treba dati vsak dan približno ob istem času.

Odmerek za posamezno žival navadno temelji na zadnji posamični določitvi telesne mase. Vendar je potrebna previdnost pri prilagajanju odmerka v zadnjem trimestni brejosti. Pri izbiri odmerka je treba uporabiti obstoječe podatke, da bi preprečili čezmerno toksičnost pri materi. Če se pri tretiranih materah opazi čezmerna toksičnost, je treba te živali humano usmrtiti. Če več živali kaže znake čezmerne toksičnosti, je treba razmisliti o prekinitvi te skupine odmerka. Če se snov daje z gavažo, jo je treba dati živali po možnosti v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Maksimalna količina tekočine, ki jo je mogoče dati naenkrat, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne mase, razen v primeru vodnih raztopin, kjer je dovoljeno uporabiti 2 ml/100 g telesne mase. Če se kot nosilec uporablja koruzno olje, količina ne sme presegati 0,4 ml/100 g telesne mase. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina pri vseh odmerkih.

1.6.6 **Opazovanje mater**

Klinična opazovanja je treba opraviti in dokumentirati najmanj enkrat na dan, najbolje vsak dan ob istem času, pri čemer se upošteva vrhunec pričakovanih učinkov po odmerjanju. Stanje živali je treba dokumentirati, vključno s smrtnostjo, odmiranjem, pomembnimi vedenjskimi spremembami in vsemi znaki očitne toksičnosti.

1.6.7 **Telesna masa in poraba hrane**

Živali je treba stehtati na dan brejosti 0 ali najpozneje tretji dan brejosti, če je živali, ki so se parile, dostavil zunanji rejec, nato na prvi dan odmerjanja, najmanj vsake 3 dni v obdobju odmerjanja in na dan predvidene usmrtitve.

▼B

Porabo hrane je treba zabeležiti vsake tri dni, na isti dan kot se določa telesna masa.

1.6.8 **Postmortalni pregled**

Samice je treba usmrtiti en dan pred pričakovano kotitvijo. Samice, ki kažejo znake splava ali predčasne kotitve pred predvideno usmrtitvijo, je treba usmrtiti in opraviti temeljit makroskopski pregled.

Ob koncu študije ali ob smrti med študijo se makroskopsko pregledajo kakršne koli strukturne anomalije ali patološke spremembe pri materi. Ocenitev matere med carskim rezom in poznejše analize fetusa naj se izvajajo po možnosti brez poznavanja tretirane skupine, da je pristranskost čim manjša.

1.6.9 **Pregled maternične vsebine**

Takoj po koncu študije ali čim prej po smrti se maternice odstranijo in ugotovi status nosečnosti živali. Maternice, ki niso videti gravidne, se še dodatno pregledajo (npr. z barvanjem z amonijevim sulfidom pri glodalcih in barvanjem po Salewskem ali ustrezno alternativno metodo pri kuncih), da se potrdi nenoseči status (5).

Gravidne maternice z materničnim vratom je treba stehtati. Masa gravidnih maternic se ne sme pridobiti od živali, za katere je ugotovljeno, da so med študijo poginile.

Pri brejih živalih se določi število rumenih telesc.

Maternično vsebino je treba pregledati glede na število embrionalnih ali fetalnih smrti in fetusov, ki so sposobni preživetja. Opisati je treba stopnjo resorpcije, da bi ocenili relativni čas smrti zarodka (glej oddelek 1.2).

1.6.10 **Pregled fetusov**

Za vsak fetus je treba določiti spol in telesno maso.

Pri vsakem fetusu je treba pregledati zunanje spremembe (6).

Pregledajo se spremembe skeleta in mehkega tkiva pri fetusih (npr. odstopanja in deformnosti ali nepravilnosti) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizacija fetalnih sprememb je zaželena, vendar ne nujna. Kadar se opravi kategorizacija, je treba jasno navesti merila za določitev vsake kategorije. Posebno pozornost je treba posvetiti reproduktivnemu traktu, ki ga je treba pregledati, če ima znake spremenjenega razvoja.

Pri glodalcih je treba pripraviti približno polovico vsakega zaroda in pregledati skeletne spremembe. Druga polovica se pripravi in pregleda glede sprememb mehkega tkiva s sprejetimi ali ustreznimi metodami serijskega razreza ali s tehnikami natančne osnovne raztelesbe.

▼B

Pri neglodalcih, npr. kuncih, se pri vseh fetusih pregledajo spremembe mehkega tkiva in skeleta. Pri telesih teh fetusov se spremembe mehkega tkiva ocenijo z natančno raztelesbo, ki lahko vključuje postopke za dodatno oceno notranje strukture srca (25). Glave polovice fetusov, ki so pregledani na ta način, se odstranijo in obdelajo za oceno sprememb mehkega tkiva (tudi oči, možganov, nosnih prehodov in jezika) z uporabo standardnih metod serijskega razreza (26) ali enako občutljivih metod. Telesa teh fetusov in preostalih nedotaknjenih fetusov se obdelajo in pregledajo glede skeletnih sprememb z enakimi metodami, kakor so opisane za glodalce.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki se sporočajo posamično za matere in njihove potomce in se povzamejo v obliki tabele, ki prikazuje za vsako preskusno skupino in vsako generacijo število živali na začetku preskusa, število živali, najdenih mrtvih ali usmrčenih iz humanih razlogov med preskusom, čas katere koli smrti ali humane usmrtitve, število brejih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanja in resnosti katerih koli toksičnih učinkov, vrsto embrionalnih/fetalnih opažanj o vseh ustreznih podatkih o zarodu.

Numerični rezultati se ocenijo z ustrezno statistično metodo z uporabo zaroda kot enote za podatkovno analizo. Uporabi se splošno sprejeta statistična metoda, statistične metode je treba določiti pri načrtovanju študije in jih utemeljiti. Sporočajo se tudi podatki o živalih, ki ne preživijo do predvidene usmrtitve. Ti podatki se lahko po potrebi vključijo v skupinske podatke. Ustreznost podatkov, dobljenih o teh živalih in vključitev ali izključitev iz katerih koli skupinskih podatkov, je treba utemeljiti ali presoditi na individualni podlagi.

2.2 VREDNOTENJE REZULTATOV

Ugotovitve študije strupenosti za predrojstveni razvoj je treba ovrednotiti glede na opažene učinke. Vrednotenje vsebuje naslednje informacije:

— rezultate preskusa pri materi in embriu/fetusu, vključno z ovrednotenjem razmerja ali njegove odsotnosti med izpostavljenostjo živali preskusni snovi in pojavom ter resnostjo vseh ugotovitev,

— merila, uporabljena za kategorizacijo zunanjih sprememb fetusa ter sprememb mehkega tkiva in skeleta, če je bila kategorizacija opravljena,

▼B

— kadar je primerno, pretekle kontrolne podatke za izboljšanje razlage rezultatov študije,

— številke, uporabljene pri izračunu vseh odstotkov ali kazalnikov,

— ustrezne statistične analize ugotovitev študije, če je to primerno, ki naj vključujejo dovolj informacij o metodi analize, tako da lahko neodvisni ocenjevalec/statistik ponovno ovrednoti in obnovi analizo,

Pri kateri koli študiji, ki dokaže odsotnost katerega koli toksičnega učinka, je treba razmisliti o nadaljnjih raziskavah za določitev absorpcije in biološke razpoložljivosti preskusne snovi.

2.3 RAZLAGA REZULTATOV

Študija strupenosti za predrojstveni razvoj zagotovi informacije o učinkih ponovne izpostavljenosti tej snovi med brej ostjo na matere in razvoj njihovih potomcev v maternici. Rezultate študije je treba razlagati skupaj z ugotovitvami subkroničnih, reprodukcijskih, toksikokinetičnih in drugih študij. Ker je poudarek tako na splošni toksičnosti v smislu toksičnosti pri materi kot na ciljnih učinkih strupenosti za razvoj, rezultati študije do določene mere omogočajo razlikovanje med razvojnimi učinki, ki se pojavijo v odsotnosti splošne toksičnosti in učinki, ki so doseženi samo na stopnjah, ki so strupene tudi za mater (27).

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje posebne informacije:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje in, kjer je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijo, vključno s številko po CAS, če je znana/določena,

— čistost.

Nosilec (po potrebi):

— utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljeno vrsto in sev,

— število in starost živali,

— izvor, nastanitvene razmere, hrano ipd.,

— maso posameznih živali na začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— utemeljitev izbire velikosti odmerka,

— podatke o sestavi preskusne snovi/pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka,

▼B

— podatke o dajanju preskusne snovi,

— preračunavanje koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne mase/dan), če je primerno,

— okoljske razmere,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

Rezultati:

Podatki o toksičnem učinkovanju pri materi po odmerku, ki vključujejo, vendar niso omejeni na:

— število živali na začetku preskusa, število preživelih živalih, število brejih in število živali, ki splavijo ali kotijo predčasno,

— dan smrti med študijo ali če živali preživijo do konca,

— podatki o živalih, ki ne preživijo do predvidene usmrtitve, se sporočijo, vendar se ne vključijo v medskupinske statistične primerjave,

— dan opazovanj a vsakega nenormalnega kliničnega znaka in poznejšega poteka,

— telesno maso, spremembo telesne mase in maso gravidne maternice, vključno, po izbiri, s spremembo telesne mase popravljeno za maso gravidne maternice,

— porabo hrane in porabo vode, če je izmerjena,

— ugotovitve obdukcije, vključno z maso maternice,

— treba je poročati o vrednostih brez opaznih škodljivih učinkov pri materi in o razvojnih učinkih.

Ciljni učinki za razvoj po odmerku na zarod z vsadki, ki vključujejo:

— število rumenih telesc,

— število vgnezditev, število in odstotek živih in mrtvih fetusov in resorpcij,

— število in odstotek izgub pred vgnezditvijo in po njej.

Ciljni učinki za razvoj po odmerku na zarod z živimi fetusi, ki vključujejo:

— število in odstotek živih potomcev,

— razmerje spolov,

— fetalna telesna masa, če je mogoče po spolu in skupno,

— zunanje deformnosti in deformnosti mehkega tkiva in skeleta ter druge ustrezne spremembe,

— merila za kategorizacijo, če je primerno,

▼B

— skupno število in odstotek fetusov in zaroda z zunanjo spremembo, spremembo mehkega tkiva ali skeleta, pa tudi vrste in pojavnost posameznih nepravilnosti in druge ustrezne spremembe.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

4. **LITERATURA**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie undExperimentelle* Pathologie 247:367.

(6) Edwards, J. A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16, 171–173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32, 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47, 229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37, 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11, 313–320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9, 398–408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8, 309–316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46, 169–181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163–173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41, 411–445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39, 61–63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36, 313–355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4, 181–188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251–277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28, 233–239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9, 37–38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126–144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56, 63798–63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55, 249–292.

▼M4

B.32 ŠTUDIJE RAKOTVORNOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 451 (2009). Prvotna TG 451 v zvezi s študijami rakotvornosti je bila sprejeta leta 1981. Priprava te revidirane preskusne metode B.32 je bila ocenjena kot nujna zaradi upoštevanja nedavnega razvoja na področju dobrobiti živali in zakonodajnih zahtev (2) (3) (4) (5) (6). Ta preskusna metoda B.32 je bila posodobljena vzporedno z revizijama poglavja B.30 te priloge z naslovom „Študije kronične strupenosti“ in poglavja B.33 te priloge z naslovom „Kombinirane študije kronične strupenosti/rakotvornosti“, da bi se z uporabo živali v študiji pridobile dodatne informacije in da bi se zagotovilo več podatkov o izbiri odmerkov. Ta preskusna metoda B.32 je zasnovana za preskušanje zelo različnih kemikalij, vključno s pesticidi in industrijskimi kemikalijami. Vendar je treba opozoriti, da so lahko nekatere podrobnosti in zahteve za farmacevtske izdelke drugačne (glej Smernico Mednarodne konference o usklajevanju (ICH) S1B o preskušanju rakotvornosti farmacevtskih izdelkov).

2. Večina študij rakotvornosti se opravi na glodavcih, zato je ta preskusna metoda namenjena zlasti uporabi v študijah, opravljenih na teh živalskih vrstah. Če bi bilo take študije treba izvesti na vrstah, ki niso glodavci, se lahko z ustreznimi prilagoditvami prav tako uporabijo načela in postopki, opisani v tej preskusni metodi, ter načela in postopki iz poglavja B.27 te priloge z naslovom „90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodavcih“ (6). Več napotkov je na voljo v Dokumentu s smernicami OECD št. 116 o zasnovi in izvajanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (7).

3. Glavni trije načini dajanja, ki se uporabljajo v študijah rakotvornosti, so oralni, dermalni in inhalacijski. Izbira načina dajanja je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti preskusne kemikalije ter prevladujočega načina izpostavljenosti ljudi. Dodatne informacije o izbiri načina izpostavljenosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

4. Ta preskusna metoda je osredotočena na oralno izpostavljenost, ki se v študijah rakotvornosti uporablja najpogosteje. Študije rakotvornosti, ki vključujejo dermalno ali inhalacijsko izpostavljenost, so lahko prav tako potrebne za oceno tveganja za zdravje ljudi in/ali na podlagi nekaterih zakonodajnih ureditev, vendar pa sta oba navedena načina izpostavljenosti tehnično precej zapletena. Take študije je treba zasnovati za vsak primer posebej, je pa mogoče preskusno metodo za ocenjevanje in vrednotenje rakotvornosti z oralnim načinom dajanja, opisano v tem dokumentu, uporabiti kot osnovo za protokol za inhalacijske in/ali dermalne študije, kar zadeva priporočila glede obdobij tretiranja, kliničnih in patoloških parametrov itd. Za dermalni (7) in inhalacijski način dajanja (7) (8) preskusnih kemikalij so na voljo napotki OECD. Pri zasnovi dolgoročnejših študij z inhalacijsko izpostavljenostjo je treba podrobno preučiti poglavji B.8 (9) in B.29 te priloge (10) ter Dokument s smernicami OECD o preskušanju akutne strupenosti pri vdihavanju (8). V primeru preskušanja z dermalnim načinom dajanja je treba upoštevati poglavje B.9 te priloge (11).

▼M4

5. S študijo rakotvornosti se pridobivajo informacije o možnih nevarnostih za zdravje, ki se lahko pojavijo ob ponavljajoči se izpostavljenosti v obdobju, ki obsega največ celotno življenjsko dobo uporabljene vrste. Z njo se pridobijo informacije o strupenih učinkih preskusne kemikalije, vključno s potencialno rakotvornostjo, lahko pa se nakažejo tudi ciljni organi in možnost kopičenja. S študijo se lahko oceni vrednost brez opaženega škodljivega učinka za strupene učinke in – v primeru rakotvornih snovi, ki niso genotoksične – za tumorske odzive, ki se lahko uporabi za določitev varnostnih meril za izpostavljenost ljudi. Poudarjena je tudi potreba po skrbnem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi kar največ informacij.

6. Cilji študij rakotvornosti, na katere se nanaša ta preskusna metoda, vključujejo:

— opredelitev rakotvornih lastnosti preskusne kemikalije, ki v primerjavi s sočasnimi kontrolnimi skupinami privedejo do povečane pojavnosti novotvorb, povečanega deleža malignih novotvorb ali skrajšanja časa do pojava novotvorb,

— opredelitev ciljnih organov rakotvornosti,

— opredelitev časa do pojava novotvorb,

— opredelitev razmerja med odmerkom in odzivom za tumorje,

— opredelitev vrednosti brez opaženega škodljivega učinka (NOAEL) ali izhodiščne točke za določitev primerjalnega odmerka (*benchmark dose* – BMD),

— ekstrapolacijo rakotvornih učinkov na stopnje izpostavljenosti ljudi pri majhnih odmerkih,

— zagotovitev podatkov za preskušanje hipotez glede načina delovanja (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ZAČETNI PREUDARKI

7. Pri ocenjevanju in vrednotenju potencialne rakotvornosti preskusne kemikalije mora preskuševalni laboratorij pred izvedbo študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji, da se zasnova študije osredotoči na učinkovitejše preskušanje rakotvornega potenciala in da se kar najbolj zmanjša uporaba živali. Informacije o načinu delovanja domnevne rakotvorne snovi in upoštevanje njenega načina delovanja (2) (7) (12) (13) (14) (15) so posebej pomembni, saj se lahko optimalna zasnova študije razlikuje glede na to, ali je preskusna kemikalija znana ali domnevna genotoksična rakotvorna snov. Več napotkov o preudarkih v zvezi z načinom delovanja je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

8. Informacije, ki pomagajo pri zasnovi študije, vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*, vključno s preskusi genotoksičnosti; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR, podatke o mutagenosti/genotoksičnosti in rakotvornosti ter druge toksikološke podatke o strukturno sorodnih snoveh; razpoložljive toksikokinetične podatke (podatke o kinetiki pri enkratnem odmerku in tudi pri ponavljajočih se odmerkih, če so na voljo)

▼M4

ter podatke, pridobljene z drugimi študijami s ponavljajočo se izpostavljenostjo. Rakotvornost je treba ocenjevati šele po pridobitvi začetnih informacij o strupenosti na podlagi 28-dnevnega in/ali 90-dnevnega preskusa strupenosti s ponavljajočimi se odmerki. Koristne informacije se lahko zagotovijo tudi s kratkoročnimi preskusi iniciacije/spodbujanja razvoja raka. V okviru splošne ocene potencialnih škodljivih učinkov določene preskusne kemikalije na zdravje je treba razmisliti o postopnem pristopu k preskušanju rakotvornosti (16) (17) (18) (19).

9. Pred začetkom študije je treba določiti najprimernejše statistične metode za analizo rezultatov ob upoštevanju zasnove in ciljev preskusa. Med vidiki, o katerih je treba razmisliti, je tudi vprašanje, ali bi morala statistika vključevati prilagoditev glede na preživetje, analizo kumulativnih tveganj tumorjev glede na trajanje preživetja, analizo časa do pojava tumorjev in analizo v primeru predčasnega prenehanja tretiranja ene ali več skupin. Napotki o primernih statističnih analizah in ključne reference mednarodno priznanih statističnih metod so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7) ter v Dokumentu s smernicami št. 35 o analizi in ocenjevanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (20).

10. Pri izvajanju študije rakotvornosti je treba vedno upoštevati vodilna načela in preudarke, opisane v Dokumentu s smernicami OECD št. 19 o prepoznavanju, ocenjevanju in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali v oceni varnosti (21), zlasti odstavek 62 navedenega dokumenta. V tem odstavku je navedeno: „*Pri študijah, ki vključujejo ponavljajoče se odmerke, je treba sprejeti premišljeno odločitev, ali naj se žival humano usmrti ali ne, če kaže klinične znake, ki se stopnjujejo in vodijo v dodatno poslabšanje njenega stanja. Ta odločitev mora vključevati razmislek o vrednosti informacij, ki bodo pridobljene z ohranitvijo zadevne živali v študiji glede na njeno splošno stanje. Če se sprejme odločitev, da se žival ohrani v preskusu, je treba po potrebi povečati pogostnost opazovanj. Obstaja tudi možnost, da se brez ogrožanja namena preskusa začasno prekine dajanje odmerkov, če bi to ublažilo bolečine ali trpljenje, ali da se zmanjša preskusni odmerek.*“

11. Podrobni napotki in razprava o načelih izbire odmerkov za študije kronične strupenosti in rakotvornosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7) ter v dveh publikacijah, ki ju je pripravil International Life Sciences Institute (22) (23). Osrednja strategija izbire odmerkov je odvisna od glavnega cilja ali ciljev študije (odstavek 6). Pri izbiri ustreznih velikosti odmerkov je treba najti ravnotežje med spremljanjem nevarnosti na eni ter opredeljevanjem učinkov majhnih odmerkov in njihovim pomenom na drugi strani. To je zlasti pomembno, kadar bo izvedena kombinirana študija kronične strupenosti in rakotvornosti (poglavje B.33 te priloge) (odstavek 12).

12. Razmisliti je treba o možnosti, da se namesto ločene izvedbe študije kronične strupenosti (poglavje B.30 te priloge) in študije rakotvornosti (ta preskusna metoda B.32) izvede kombinirana študija kronične strupenosti in rakotvornosti (poglavje B.33 te priloge). S kombiniranim preskusom se v primerjavi z izvedbo dveh ločenih študij zagotovi večja učinkovitost v smislu časa in stroškov, ne da bi bila pri tem ogrožena kakovost podatkov v fazi v zvezi s kronično strupenostjo ali fazi v zvezi z rakotvornostjo. Vendar je treba pri izvajanju kombinirane študije kronične strupenosti in rakotvornosti (poglavje B.33 te priloge) skrbno upoštevati načela izbire odmerkov (odstavki 11 in 22–25), poleg tega pa se tudi priznava, da se na podlagi nekaterih zakonodajnih okvirov lahko zahteva ločena izvedba študij.

▼M4

13. Pojmi, ki se uporabljajo v okviru te preskusne metode, so opredeljeni na koncu tega poglavja in v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

NAČELO PRESKUSA

14. Preskusna kemikalija se dnevno v stopnjevanih odmerkih daje več skupinam preskusnih živali, pri čemer preskus traja večino njihove življenjske dobe, način dajanja pa je navadno oralni. Primerno je lahko tudi preskušanje z inhalacijskim ali dermalnim načinom dajanja. Živali je treba pozorno opazovati, da se odkrijejo znaki strupenosti in nastanek neoplastičnih lezij. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in se na njih opravi obdukcija.

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

15. Ta preskusna metoda je namenjena predvsem ocenjevanju in vrednotenju rakotvornosti pri glodavcih (odstavek 2). O uporabi vrst, ki niso glodavci, se lahko razmisli, kadar razpoložljivi podatki kažejo, da so ustreznejše za napovedovanje učinkov na zdravje ljudi. Izbiro živalske vrste je treba utemeljiti. Priporočena vrsta glodavca je podgana, uporabijo pa se lahko tudi druge vrste glodavcev, npr. miš. Čeprav je uporabnost miši pri preskušanju rakotvornosti lahko omejena (24) (25) (26), se lahko z nekaterimi veljavnimi zakonodajnimi ureditvami še vedno zahteva preskušanje rakotvornosti na miših, razen če se ugotovi, da taka študija z znanstvenega vidika ni nujna. Podgane in miši so najprimernejši preskusni modeli zaradi njihove razmeroma kratke življenjske dobe, razširjene uporabe v farmakoloških in toksikoloških študijah, občutljivosti za indukcijo tumorjev ter razpoložljivosti dovolj opredeljenih sevov. Zaradi teh lastnosti je na voljo veliko informacij o njihovi fiziologiji in patologiji. Dodatne informacije o izbiri živalske vrste in seva so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

16. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Po možnosti je treba v študiji rakotvornosti uporabiti isti sev in izvor živali kot v predhodnih krajših študijah strupenosti, čeprav je treba – če je znano, da se pri živalih zadevnega seva in izvora pojavljajo težave pri doseganju običajno sprejetih meril preživetja za dolgoročne študije (glej Dokument s smernicami št. 116 (7)) – razmisliti o uporabi seva živali, katerega stopnja preživetja je sprejemljiva za dolgoročno študijo. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje.

Nastanitev in hranjenje

17. Živali se lahko nastanijo posamično ali dajo v kletke v manjših skupinah istega spola; posamična nastanitev se lahko predvidi samo, če je znanstveno utemeljena (27) (28) (29). Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Temperatura prostora s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, mora biti cilj 50- do 60-odstotna vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Hrana mora zadovoljevati vse prehranske potrebe preskušane živalske vrste, vsebnost kontaminantov, med drugim ostankov

▼M4

pesticidov, obstojnih organskih onesnaževal, fitoestrogenov, težkih kovin in mikotoksinov, ki lahko vplivajo na rezultat preskusa, pa mora biti čim manjša. Redno je treba pripravljati analitske informacije o ravneh kontaminantov v hranilih in hrani, vsaj na začetku študije in kadar se zamenja serija uporabljane kemikalije, ter jih vključiti v končno poročilo. Prav tako je treba zagotoviti analitske informacije o pitni vodi, uporabljeni v študiji. Kadar se preskusna kemikalija daje s hrano, lahko na izbiro hrane vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije in zadovoljevanju prehranskih potreb živali.

Priprava živali

18. Uporabiti je treba zdrave živali, ki so se najmanj 7 dni prilagajale laboratorijskim razmeram in še niso bile vključene v preskusne postopke. V primeru glodavcev je treba odmerke začeti dajati čim prej po odstavitvi od sesanja in prilagajanju na okolje, po možnosti preden so živali stare 8 tednov. Opredeliti je treba vrsto, sev, izvor, spol, težo in starost preskusnih živali. Ob začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali za vsak spol čim manjše, njihova teža pa ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže vseh živali v študiji glede na spol. Živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Po randomizaciji med skupinami v okviru vsakega spola ne sme biti večjih razlik v povprečni telesni teži. Če obstajajo statistično pomembne razlike, je treba fazo randomizacije ponoviti, če je to mogoče. Vsaki živali je treba dodeliti edinstveno identifikacijsko številko in jo trajno označiti s to številko s tetovažo, vsaditvijo mikročipa ali drugo ustrezno metodo.

POSTOPEK

Število in spol živali

19. Uporabiti je treba oba spola. Živali mora biti dovolj za temeljito biološko in statistično ocenjevanje. Zato mora vsaka odmerna skupina in sočasna kontrolna skupina vsebovati najmanj 50 živali vsakega spola. Glede na namen študije je mogoče povečati statistično moč ključnih ocen z neenakim dodeljevanjem živali različnim odmernim skupinam, tako da je v skupinah, tretiranih z majhnimi odmerki, več kot 50 živali, npr. za ocenjevanje rakotvornega potenciala pri majhnih odmerkih. Vendar se je treba zavedati, da je ob zmernem povečanju velikosti skupine povečanje statistične moči študije razmeroma majhno. Več informacij o statistični zasnovi študije in izbiri velikosti odmerkov za čim obsežnejše povečanje statistične moči je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

Uporaba vmesnih usmrtitev in satelitskih (opozorilnih) skupin

20. Če je to znanstveno utemeljeno, se lahko v študiji predvidijo vmesne usmrtitve, npr. pri 12 mesecih, da se zagotovijo informacije o napredovanju neoplastičnih sprememb in mehanistične informacije. Kadar so take informacije že na voljo iz prejšnjih študij strupenosti s ponavljajočimi se odmerki v zvezi z zadevno preskusno kemikalijo, vmesne usmrtitve morda niso znanstveno utemeljene. Če se v zasnovo študije vključijo vmesne usmrtitve, število živali v vsaki odmerni skupini, za katere se načrtuje vmesna usmrtitev, navadno znaša 10 živali na spol, skupno število živali v zasnovi študije pa je treba povečati za toliko, kolikor se jih namerava usmrtiti pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko po potrebi predvidi dodatna skupina opozorilnih živali (običajno 5 živali vsakega spola) za spremljanje patološkega stanja med študijo (30). Več napotkov je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

▼M4

Odmerne skupine in odmerjanje

21. Napotki glede vseh vidikov izbire odmerkov in razporeditve njihovih velikosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7). Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in sočasno kontrolo. Velikosti odmerkov navadno temeljijo na rezultatih kratkoročnejših študij s ponavljajočimi se odmerki ali študij za ugotavljanje območja, pri njihovem določanju pa je treba upoštevati vse obstoječe toksikološke in toksikokinetične podatke, ki so na voljo za preskusno kemikalijo ali sorodne snovi.

22. Razen kadar zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ali bioloških učinkov preskusne kemikalije to ni mogoče, je treba največjo velikost odmerka izbrati za opredelitev glavnih ciljnih organov in strupenih učinkov, pri čemer se je treba izogibati povzročanju trpljenja, hude zastrupitve, obolevnosti ali smrti. Ob upoštevanju dejavnikov, navedenih v odstavku 23 spodaj, je treba največji odmerek praviloma izbrati tako, da se izzovejo znaki strupenosti, na primer upočasnitev pridobivanja telesne teže (približno 10-odstotna). Vendar se lahko glede na cilje študije (glej odstavek 6) izbere tudi največji odmerek, manjši od odmerka, ki povzroča znake strupenosti, npr. če odmerek izzove škodljiv učinek, ki vzbuja zaskrbljenost, ne vpliva pa bistveno na življenjsko dobo ali telesno težo.

23. Velikosti odmerkov in razporeditev med njimi se lahko izberejo za določanje odziva v odvisnosti od odmerka in – glede na način delovanja preskusne kemikalije – vrednosti NOAEL ali drugega želenega rezultata študije, npr. BMD (glej odstavek 25) pri najmanjšem odmerku. Dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določitvi manjših odmerkov, vključujejo pričakovani naklon krivulje odmerek-odziv, odmerke, pri katerih se lahko pojavijo pomembne spremembe v presnovi ali načinu strupenega delovanja, velikost, pri kateri se pričakuje prag, ali velikost, pri kateri se pričakuje izhodiščna točka za ekstrapolacijo majhnih odmerkov.

24. Izbrana razporeditev velikosti odmerkov je odvisna od lastnosti preskusne kemikalije in je v tej preskusni metodi ni mogoče predpisati, vendar dva- do štirikratni intervali velikokrat zagotovijo visoko učinkovitost preskusa pri določanju padajočih velikosti odmerkov, namesto uporabe zelo velikih intervalov (npr. večjih od faktorja približno 6–10) med odmerki pa je pogosto primerneje dodati četrto preskusno skupino. Na splošno se je treba izogibati uporabi faktorjev, večjih od 10, če se uporabijo, pa je to treba utemeljiti.

25. Kot je nadalje opisano v Dokumentu s smernicami št. 116 (7), je treba pri izbiri odmerkov upoštevati:

— znane ali domnevne nelinearnosti ali točke pregiba na krivulji odmerek-odziv,

— toksikokinetiko in odmerna območja, v katerih se pojavljajo ali ne pojavljajo presnovna indukcija, nasičenje ali nelinearnost med zunanjimi in notranjimi odmerki,

— prekurzorske lezije, označevalce učinka ali kazalnike delovanja ključnih temeljnih bioloških procesov,

— ključne (ali domnevne) vidike načina delovanja, kot so odmerki, pri katerih se začne pojavljati citotoksičnost, so ravni hormonov motene, homeostatični mehanizmi preobremenjeni itd.,

▼M4

— predele krivulje odmerek-odziv, v katerih je potrebna posebno zanesljiva ocena, npr. v območju pričakovanega BMD ali predvidenega praga,

— preudarke v zvezi s pričakovanimi stopnjami izpostavljenosti ljudi.

26. Kontrolna skupina je netretirana skupina ali kontrolna skupina z nosilcem, če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja nosilec. Z živalmi v kontrolni skupini je treba ravnati enako kot z živalmi v preskusnih skupinah, le da se ne tretirajo s preskusno kemikalijo. Če se uporablja nosilec, mora kontrolna skupina prejeti največjo količino nosilca, ki je bila uporabljena med odmernimi skupinami. Če se preskusna snov daje s hrano in se s tem zaradi njene manjše okusnosti povzroči bistveno zmanjšanje vnosa hrane, je lahko koristna dodatna, po parih hranjena kontrolna skupina, ki se uporablja kot primernejša kontrola.

Priprava odmerkov in dajanje preskusne kemikalije

27. Preskusna kemikalija se običajno daje oralno, s hrano ali pitno vodo oziroma z gavažo. Dodatne informacije o načinih in metodah dajanja so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7). Način in metoda dajanja sta odvisna od namena študije, fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, njene biološke dostopnosti ter prevladujočega načina in metode izpostavljenosti ljudi. Izbrani način in metodo dajanja je treba utemeljiti. Zaradi dobrobiti živali je treba oralno gavažo praviloma izbrati samo pri tistih snoveh, pri katerih sta ta način in metoda dajanja razumno reprezentativna za potencialno izpostavljenost ljudi (npr. pri farmacevtskih izdelkih). Prehranske in okoljske kemikalije, vključno s pesticidi, se navadno dajejo s hrano ali pitno vodo. Pri nekaterih scenarijih, npr. izpostavljenosti na delovnem mestu, pa so lahko primernejši drugi načini dajanja.

28. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Upoštevati je treba naslednje lastnosti nosilca in drugih aditivov, kot je ustrezno: učinke na absorpcijo, porazdelitev, presnovo ali retencijo preskusne kemikalije, učinke na kemijske lastnosti preskusne kemikalije, ki lahko spremenijo njene strupene lastnosti, ter učinke na porabo hrane ali vode ali na prehranjenost živali. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/emulzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih nosilcih. Pri nevodnih nosilcih morajo biti strupene lastnosti nosilca znane. Na voljo morajo biti informacije o stabilnosti preskusne kemikalije in homogenosti raztopin ali hrane, ki se bodo uporabljale v preskusu (kot je ustrezno), v pogojih dajanja (npr. s hrano).

29. Pri kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Pri dolgoročnih študijah strupenosti, pri katerih se uporablja dajanje s hrano, koncentracija preskusne kemikalije v hrani praviloma ne sme presegati zgornje meje 5 % vse hrane, da se preprečijo prehranska neravnovesja. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (mg/kg hrane ali ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali (mg/kg telesne teže), ki se izračuna vsak teden. Uporabljeni način je treba navesti.

▼M4

30. V primeru oralnega dajanja živali dobivajo odmerek preskusne kemikalije vsak dan (sedem dni na teden), preskusno obdobje pa pri glodavcih navadno traja 24 mesecev (glej tudi odstavek 32). Vsak drugačen režim odmerjanja, npr. pet dni na teden, je treba utemeljiti. V primeru dermalnega dajanja so živali s preskusno kemikalijo navadno tretirane vsaj 6 ur na dan 7 dni na teden, kot je navedeno v poglavju B.9 te priloge (11), prek obdobja 24 mesecev. Inhalacijska izpostavljenost se izvaja 6 ur na dan 7 dni na teden, uporabiti pa je mogoče tudi izpostavljenost 5 dni na teden, če je utemeljena. Obdobje izpostavljenosti praviloma traja 24 mesecev. Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljša obdobja izpostavljenosti prilagodijo, da se kar najbolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Obdobja izpostavljenosti, krajša od 6 ur na dan, je treba utemeljiti. Glej tudi poglavje B.8 te priloge (9).

31. Če se preskusna kemikalija živalim daje z gavažo, je treba pri tem uporabljati želodčno cevko ali ustrezno intubacijsko kanilo, postopek pa opravljati vsak dan ob podobnem času. Običajno živali dobijo enkraten odmerek enkrat na dan, če pa je kemikalija na primer lokalni dražljivec, se lahko dnevno odmerjena količina ohranja tudi z dajanjem polovičnih odmerkov (dvakrat na dan). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. To količino je treba ohranjati tako majhno, kot je praktično, praviloma pa pri glodavcih ne sme preseči 1 ml/100 g telesne teže (31). Spremenljivost preskusne količine je treba kar najbolj zmanjšati s prilagajanjem koncentracije, da se zagotovi konstantna količina pri vseh velikostih odmerkov. Izjema so potencialno jedke ali dražilne kemikalije, ki jih je treba razredčiti, da se preprečijo resni lokalni učinki. Preskušanju pri koncentracijah, pri katerih obstaja verjetnost jedkosti ali dražilnosti za prebavni trakt, se je treba izogibati.

Trajanje študije

32. Študija pri glodavcih navadno traja 24 mesecev, kar ustreza večini normalne življenjske dobe živali, ki bodo uporabljene. Glede na življenjsko dobo in sev živalske vrste v študiji se lahko uporabijo tudi krajša ali daljša obdobja študije, vendar je treba to utemeljiti. Za nekatere seve miši, npr. AKR/J, C3H/J ali C57BL/6J, je lahko primernejše 18-mesečno obdobje. V nadaljevanju je nekaj napotkov o trajanju in zaključku študije ter preživetju; več napotkov, vključno s preudarki o sprejemljivosti negativnih rezultatov študije rakotvornosti glede na preživetje v študiji, je na voljo v Dokumentu s smernicami OECD št. 116 o zasnovi in izvajanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (7).

— Kadar število preživelih živali v skupinah, tretiranih z manjšimi odmerki, ali kontrolni skupini pade pod 25 %, je treba razmisliti o zaključku študije.

— Kadar zaradi strupenosti prezgodaj poginejo samo živali v skupini, tretirani z velikim odmerkom, to ne sme biti razlog za zaključek študije.

— Preživetje je treba obravnavati ločeno za vsak spol.

— Študija se ne sme podaljševati prek točke, ko razpoložljivi podatki iz študije ne zadoščajo več za statistično veljavno oceno.

▼M4

OPAZOVANJA

33. Vse živali je treba pregledovati za odkrivanje obolevnosti ali smrtnosti, običajno na začetku in koncu vsakega dne, vključno s konci tedna in prazniki. Poleg tega je treba živali pregledati enkrat na dan za odkrivanje konkretnih toksikološko pomembnih znakov, ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka, če gre za dajanje z gavažo. Posebno pozornost je treba nameniti nastanku tumorjev ter zabeležiti čas nastopa, mesto, mere, videz in progresijo vsakega makroskopsko vidnega ali otipljivega tumorja.

Telesna teža, poraba hrane/vode in izkoristek hrane

34. Vse živali je treba stehtati na začetku tretiranja, vsaj enkrat na teden prvih 13 tednov, zatem pa najmanj enkrat na mesec. Meritve porabe in izkoristka hrane je treba prvih 13 tednov opravljati vsaj enkrat na teden, nato pa najmanj enkrat na mesec. Kadar se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba porabo vode prvih 13 tednov meriti vsaj enkrat na teden, zatem pa najmanj enkrat na mesec. O meritvah porabe vode je treba razmisliti tudi pri študijah, pri katerih se spremenijo vzorci pitja.

Hematološke, klinične biokemične in druge meritve

35. Da bi se s študijo pridobilo kar največ informacij, zlasti kar zadeva razmisleke o načinu delovanja, se lahko jemljejo vzorci krvi za hematološke in klinične biokemične preiskave, o čemer odloči vodja študije. Primerna je lahko tudi analiza urina. Več napotkov o vrednosti jemanja takih vzorcev v okviru študije rakotvornosti je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7). Če se štejeta za primerna, se lahko odvzem vzorcev krvi za hematološke in klinične kemične preiskave ter analiza urina opravita kot del vmesne usmrtitve (odstavek 20) ter ob zaključku študije na najmanj 10 živalih na spol na skupino. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu, na primer s punkcijo srca ali iz retroorbitalnega sinusa, medtem ko je žival v anesteziji, in jih shraniti, če je ustrezno, v primernih pogojih. Za pregled se lahko pripravijo tudi krvni razmazi, zlasti če kaže, da je ciljni organ kostni mozeg, čeprav so bili izraženi dvomi o vrednosti takega pregleda za ocenjevanje rakotvornega/onkogenega potenciala (32).

PATOLOGIJA

Makroskopska obdukcija

36. Na vseh živalih v študiji, razen na opozorilnih (glej odstavek 20) in drugih satelitskih živalih, se opravi popolna in natančna makroskopska obdukcija, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Za opozorilne in druge satelitske živali je lahko obdukcija potrebna v posameznih primerih, o čemer odloča vodja študije. Tehtanje organov navadno ni del študije rakotvornosti, saj je zaradi sprememb, povezanih s staranjem, v poznejših fazah pa zaradi nastanka tumorjev, lahko motena koristnost podatkov o teži organov. So pa lahko ti podatki odločilni za oceno zanesljivosti dokazov in zlasti za preudarke v zvezi z načinom delovanja. Če je teža organov del satelitske študije, jo je treba izmeriti najpozneje 1 leto po začetku študije.

▼**M4**

37. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo (33) (tkiva v oglatih oklepajih niso obvezna):

vse vidne lezije	srce	trebušna slinavka	želodec (predželodec, žlezni želodec)
nadledvična žleza	vito črevo	obščitnica	[zobje]
aorta	tešče črevo	periferni živec	modo
možgani (vključno z rezinami velikih in malih možganov ter podaljšane hrbtenjače/mosta)	ledvica	hipofiza	priželjc
slepo črevo	solzna žleza (zunaj očesne votline)	prostata	ščitnica
maternični vrat	jetra	rektum	[jezik]
koagulacijska žleza	pljuča	žleza slinavka	sapnik
debelo črevo	bezgavke (povrhnje in globoke)	semenski mešiček	sečni mehur
dvanajsternik	mlečna žleza (obvezna za samice, in če jo je mogoče secirati s prostim očesom, za samce)	skeletna mišica	maternica (vključno z vratom)
nadmodek	[zgornja dihala, vključno z nosom, nosnimi školjkami in obnosnimi votlinami]	koža	[sečevod]
oko (vključno z mrežnico)	požiralnik	hrbtenjača (na treh ravneh: vratni, prsni in ledveni)	[sečnica]
[stegnenica s sklepom]	[vohalni betič]	vranica	vagina
žolčnik (pri vrstah, ki niso podgane)	jajčnik	[prsnica]	rezina in/ali svež punktat kostnega mozga
Harderjeva žleza			

Pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba shraniti oba organa. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije. V študijah z dermalnim načinom dajanja je treba shraniti iste organe, kot so določeni na seznamu za oralni način, bistveno pa je posebno vzorčenje in shranjevanje kože z mesta nanosa. V inhalacijskih študijah je treba v zvezi s seznamom shranjenih in pregledanih tkiv dihal slediti priporočilom iz poglavij B.8 in B.29 te priloge. Za druge organe/tkiva (in poleg posebej shranjenih tkiv dihal) je treba preučiti seznam organov, določen za oralni način dajanja.

▼M4

Histopatologija

38. Na voljo so napotki o najboljših praksah pri izvajanju toksikoloških patoloških študij (33). Pregledati je treba vsaj naslednja tkiva:

— vsa tkiva živali iz skupine, tretirane z velikim odmerkom, in kontrolne skupine,

— vsa tkiva živali, ki so poginile ali bile usmrčene med študijo,

— vsa tkiva, ki kažejo makroskopske abnormalnosti, vključno s tumorji,

— kadar so bile v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opažene s tretiranjem povezane histopatološke spremembe, je treba pregledati ista tkiva vseh živali iz vseh drugih odmernih skupin,

— pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba pregledati oba organa.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

39. Navesti je treba podatke za posamezne živali za vse ocenjevane parametre. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navede število živali na začetku preskusa, število živali, ki so bile med preskusom najdene poginule ali so bile usmrčene iz humanih razlogov, in čas vsake smrti ali humane usmrtitve, število živali, ki kažejo znake zastrupitve, opis opaženih znakov zastrupitve, vključno s časom njihovega nastopa, trajanjem in resnostjo vseh strupenih učinkov, ter število živali, pri katerih so opažene lezije, vrste lezij in odstotek živali, pri katerih je opažena posamezna vrsta lezije. V preglednicah s povzetimi podatki je treba navesti srednje vrednosti in standardne odklone (za preskusne podatke, ki se nenehno zbirajo) za živali, pri katerih so opaženi strupeni učinki ali lezije, ter razvrstitev lezij.

40. Pretekli kontrolni podatki so lahko dragoceni za razlago rezultatov študije, npr. kadar obstajajo znaki, da podatki, zagotovljeni s sočasnimi kontrolami, bistveno odstopajo od nedavnih podatkov, pridobljenih na kontrolnih živalih iz istega preskuševalnega laboratorija/kolonije. Če se ocenjujejo pretekli kontrolni podatki, morajo izhajati iz istega laboratorija ter se nanašati na živali iste starosti in seva, poleg tega pa morajo biti pridobljeni v petih letih pred zadevno študijo.

41. Če je ustrezno, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Statistične metode in podatke, ki bodo analizirani, je treba izbrati pri zasnovi študije (odstavek 9). V izbiri je treba predvideti prilagoditve glede na preživetje, če so potrebne.

Poročilo o preskusu

42. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijske podatke,

▼M4

— izvor kemikalije,

— številko serije,

— potrdilo o kemijski analizi.

Nosilec (če je ustrezno)

— utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda).

Preskusne živali

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev izbire,

— število, starost in spol živali na začetku preskusa,

— izvor, nastanitvene pogoje, hrano itd.,

— težo vsake živali ob začetku preskusa.

Preskusni pogoji

— utemeljitev načina dajanja in izbire odmerkov,

— če je ustrezno, uporabljene statistične metode za analizo podatkov,

— podatke o formulaciji preskusne kemikalije/pripravi hrane,

— analitske podatke o doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka,

— način dajanja in podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— za inhalacijske študije informacijo, ali je bila uporabljena izpostavljenost nosu ali izpostavljenost celega telesa,

— dejanske odmerke (mg/kg telesne teže/dan) in faktor za pretvorbo koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (mg/kg ali ppm) v dejanski odmerek, če je ustrezno,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

Rezultati (predstaviti je treba povzete podatke v preglednicah in podatke za posamezne živali)

Splošno

— podatke o preživetju,

— telesno težo/spremembe telesne teže,

— porabo hrane, izračune izkoristka hrane, če so bili narejeni, in porabo vode, če je ustrezno,

— toksikokinetične podatke (če so na voljo),

— oftalmoskopiranje (če so podatki na voljo),

— hematologijo (če so podatki na voljo),

— klinično kemijo (če so podatki na voljo).

▼M4

Klinični izsledki

— znake zastrupitve,

— pojavnost (in resnost, če se ocenjuje) vseh abnormalnosti,

— vrsto, resnost in trajanje kliničnih opažanj (prehodnih ali trajnih).

Obdukcijski podatki

— terminalno telesno težo,

— težo organov in razmerja med težami organov, če je ustrezno,

— izsledke obdukcije; pojavnost in resnost abnormalnosti.

Histopatologija

— neneoplastične ugotovitve histopatoloških preiskav,

— neoplastične ugotovitve histopatoloških preiskav,

— povezanost makroskopskih in mikroskopskih ugotovitev,

— podroben opis vseh s tretiranjem povezanih ugotovitev histopatoloških preiskav, vključno z razvrstitvami resnosti,

— navedbo morebitnih medsebojnih strokovnih pregledov mikroskopskih preparatov.

Statistična obdelava rezultatov, če je ustrezno

Razprava o rezultatih

— razpravo o pristopih modeliranja,

— razmerja med odmerkom in odzivom,

— pretekle kontrolne podatke,

— preučitev vseh informacij o načinu delovanja,

— določitev BMD, NOAEL ali LOAEL,

— pomembnost za ljudi.

Sklepi.

VIRI:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rim, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Pariz.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

(3) Combes, R. D., Gaunt, I., Balls, M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

(4) Barlow, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., idr. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

(5) Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

(6) Poglavje B.27 te priloge, Preskus subkronične oralne toksičnosti: 90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodalcih.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druga izdaja. Series on Testing and Assessment No. 116, na voljo na javni spletni strani OECD o smernicah za preskušanje na naslovu www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

(9) Poglavje B.8 te priloge, Subakutna strupenost pri vdihavanju: 28-dnevna študija.

(10) Poglavje B.29 te priloge, Subkronična strupenost pri vdihavanju: 90-dnevna študija.

(11) Poglavje B.9 te priloge, Strupenost (v stiku s kožo) pri ponavljajočem se odmerku (28 dni).

(12) Boobis, A. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M. E., Vickers, C., Willcocks, D., Farland, W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793–801.

(13) Cohen, S. M., Meek, M. E., Klaunig, J. E., Patton, D. E., in Fenner-Crisp, P. A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581–589.

(14) Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. N., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., Dragan, Y. P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51–56.

(15) Meek, E. M., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKemmon, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D. E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591–653.

(16) Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R., idr. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

(17) Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T., idr. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

(18) Doe, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A., idr. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

(19) Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M., idr. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Pariz.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

▼M4

(22) Rhomberg, L. R., Baetcke, K., Blancato, J., Bus, J., Cohen, S., Conolly, R., Dixit, R., Doe, J., Ekelman, K., Fenner-Crisp, P., Harvey, P., Hattis, D., Jacobs, A., Jacobson-Kram, D., Lewandowski, T., Liteplo, R., Pelkonen, O., Rice, J., Somers, D., Turturro, A., West, W., Olin, S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran, J. A. (ur.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths, S. A., Parkinson, C., McAuslane, J. A. N., in Lumley, C. E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

(25) Usui, T., Griffiths, S. A., in Lumley, C. E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. V: D'Arcy POF & Harron DWG (ur.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. str. 279–284.

(26) Carmichael, N. G., Enzmann, H., Pate, I., Waechter, F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105: 1196–1203.

(27) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21: 15–23.

(32) Weingand, K., idr. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(33) Crissman, J., Goodman, D., Hildebrandt, P., idr. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

B.33 KOMBINIRANE ŠTUDIJE KRONIČNE STRUPENOSTI/RAKOTVORNOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 453 (2009). Prvotna TG 453 je bila sprejeta leta 1981. Priprava te posodobljene preskusne metode B.33 je bila ocenjena kot nujna zaradi upoštevanja nedavnega razvoja na področju dobrobiti živali in zakonodajnih zahtev (1) (2) (3) (4) (5). Ta preskusna metoda B.33 je bila posodobljena vzporedno z revizijama poglavja B.32 te priloge z naslovom „Študije rakotvornosti“ in poglavja B.30 te priloge z naslovom „Študije kronične strupenosti“, da bi se z uporabo živali v študiji pridobile dodatne informacije in da bi se zagotovilo več podatkov o izbiri odmerkov. Ta preskusna metoda je zasnovana za preskušanje zelo različnih kemikalij, vključno s pesticidi in industrijskimi kemikalijami. Vendar je treba opozoriti, da so lahko nekatere podrobnosti in zahteve za farmacevtske izdelke drugačne (glej Smernico Mednarodne konference o usklajevanju (ICH) S1B o preskušanju rakotvornosti farmacevtskih izdelkov).

2. Večina študij kronične strupenosti in rakotvornosti se opravi na glodavcih, zato je ta preskusna metoda namenjena zlasti uporabi v študijah, opravljenih na teh živalskih vrstah. Če bi bilo take študije treba izvesti na vrstah, ki niso glodavci, se lahko z ustreznimi prilagoditvami prav tako uporabijo načela in postopki, opisani v tej metodi, ter načela in postopki iz poglavja B.27 te priloge z naslovom „90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodavcih“ (6), kot je navedeno v Dokumentu s smernicami OECD št. 116 o zasnovi in izvajanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (7).

3. Glavni trije načini dajanja, ki se uporabljajo v študijah kronične strupenosti/rakotvornosti, so oralni, dermalni in inhalacijski. Izbira načina dajanja je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti preskusne kemikalije ter prevladujočega načina izpostavljenosti ljudi. Dodatne informacije o izbiri načina izpostavljenosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

4. Ta preskusna metoda je osredotočena na oralno izpostavljenost, ki se v študijah kronične strupenosti in rakotvornosti uporablja najpogosteje. Dolgoročne študije, ki vključujejo dermalno ali inhalacijsko izpostavljenost, so lahko prav tako lahko potrebne za oceno tveganja za zdravje ljudi in/ali na podlagi nekaterih zakonodajnih ureditev, vendar pa sta oba navedena načina izpostavljenosti tehnično precej zapletena. Take študije je treba zasnovati za vsak primer posebej, je pa mogoče preskusno metodo za ocenjevanje in vrednotenje kronične strupenosti in rakotvornosti z oralnim načinom dajanja, opisano v tem dokumentu, uporabiti kot osnovo za protokol za inhalacijske in/ali dermalne študije, kar zadeva priporočila glede obdobij tretiranja, kliničnih in patoloških parametrov itd. Za inhalacijski (7) (8) in dermalni način dajanja (7) preskusnih kemikalij so na voljo napotki OECD. Pri zasnovi dolgoročnejših študij z inhalacijsko izpostavljenostjo je treba podrobno preučiti poglavji B.8 (9) in B.29 te priloge (10) ter Dokument s smernicami OECD o preskušanju akutne strupenosti pri vdihavanju (8). V primeru preskušanja z dermalnim načinom dajanja je treba upoštevati poglavje B.9 te priloge (11).

▼M4

5. S kombinirano študijo kronične strupenosti/rakotvornosti se pridobivajo informacije o možnih nevarnostih za zdravje, ki se lahko pojavijo ob ponavljajoči se izpostavljenosti v obdobju, ki obsega največ celotno življenjsko dobo uporabljene vrste. Z njo se pridobijo informacije o strupenih učinkih preskusne kemikalije, vključno s potencialno rakotvornostjo, nakažejo se ciljni organi in možnost kopičenja. S študijo se lahko oceni vrednost brez opaženega škodljivega učinka za strupene učinke in – v primeru rakotvornih snovi, ki niso genotoksične – za tumorske odzive, ki se lahko uporabi za določitev varnostnih meril za izpostavljenost ljudi. Poudarjena je tudi potreba po skrbnem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi kar največ informacij.

6. Cilji študij kronične strupenosti/rakotvornosti, na katere se nanaša ta preskusna metoda, vključujejo:

— opredelitev rakotvornih lastnosti preskusne kemikalije, ki v primerjavi s sočasnimi kontrolnimi skupinami privedejo do povečane pojavnosti novotvorb, povečanega deleža malignih novotvorb ali skrajšanja časa do pojava novotvorb,

— opredelitev časa do pojava novotvorb,

— opredelitev kronične strupenosti preskusne kemikalije,

— opredelitev ciljnih organov kronične strupenosti in rakotvornosti,

— opredelitev razmerja med odmerkom in odzivom,

— opredelitev vrednosti brez opaženega škodljivega učinka (NOAEL) ali izhodiščne točke za določitev primerjalnega odmerka (*benchmark dose* – BMD),

— ekstrapolacijo rakotvornih učinkov na stopnje izpostavljenosti ljudi pri majhnih odmerkih,

— napoved učinkov kronične strupenosti pri stopnjah izpostavljenosti ljudi,

— zagotovitev podatkov za preskušanje hipotez glede načina delovanja (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ZAČETNI PREUDARKI

7. Pri ocenjevanju in vrednotenju potencialne rakotvornosti in kronične strupenosti preskusne kemikalije mora preskuševalni laboratorij pred izvedbo študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji, da se zasnova študije osredotoči na učinkovitejše preskušanje toksikoloških lastnosti te kemikalije in da se kar najbolj zmanjša uporaba živali. Informacije o načinu delovanja domnevne rakotvorne snovi in upoštevanje njenega načina delovanja (2) (7) (12) (13) (14) (15) so posebej pomembni, saj se lahko optimalna zasnova študije razlikuje glede na to, ali je preskusna kemikalija znana ali domnevna genotoksična rakotvorna snov. Več napotkov o preudarkih v zvezi z načinom delovanja je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

8. Informacije, ki pomagajo pri zasnovi študije, vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; vse informacije o načinu delovanja; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*, vključno s preskusi genotoksičnosti; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR, podatke o mutagenosti/genotoksičnosti in rakotvornosti ter druge toksikološke podatke o strukturno sorodnih snoveh; razpoložljive toksikokinetične podatke (podatke o kinetiki pri enkratnem odmerku in tudi pri ponavljajočih se odmerkih, če so na voljo) ter podatke, pridobljene z drugimi študijami s

▼M4

ponavljajočo se izpostavljenostjo. Kronično strupenost/rakotvornost je treba ugotavljati šele po pridobitvi začetnih informacij o strupenosti na podlagi 28-dnevnega in/ali 90-dnevnega preskusa strupenosti s ponavljajočimi se odmerki. Koristne informacije se lahko zagotovijo tudi s kratkoročnimi preskusi iniciacije/spodbujanja razvoja raka. V okviru splošne ocene potencialnih škodljivih učinkov določene preskusne kemikalije na zdravje je treba razmisliti o postopnem pristopu k preskušanju rakotvornosti (16) (17) (18) (19).

9. Pred začetkom študije je treba določiti najprimernejše statistične metode za analizo rezultatov ob upoštevanju zasnove in ciljev preskusa. Med vidiki, ki jih je treba preučiti, je tudi vprašanje, ali bi morala statistika vključevati prilagoditev glede na preživetje, analizo kumulativnih tveganj tumorjev glede na trajanje preživetja, analizo časa do pojava tumorjev in analizo v primeru predčasnega prenehanja tretiranja ene ali več skupin. Napotki o primernih statističnih analizah in ključne reference mednarodno priznanih statističnih metod so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7) ter v Dokumentu s smernicami št. 35 o analizi in ocenjevanju študij kronične strupenosti in rakotvornosti (20).

10. Pri izvajanju študije rakotvornosti je treba vedno upoštevati vodilna načela in preudarke, opisane v Dokumentu s smernicami OECD o prepoznavanju, ocenjevanju in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali v oceni varnosti (21), zlasti odstavek 62 navedenega dokumenta. V tem odstavku je navedeno: „*Pri študijah, ki vključujejo ponavljajoče se odmerke, je treba sprejeti premišljeno odločitev, ali naj se žival humano usmrti ali ne, če kaže klinične znake, ki se stopnjujejo in vodijo v dodatno poslabšanje njenega stanja. Ta odločitev mora vključevati razmislek o vrednosti informacij, ki bodo pridobljene z ohranitvijo zadevne živali v študiji glede na njeno splošno stanje. Če se sprejme odločitev, da se žival ohrani v preskusu, je treba po potrebi povečati pogostnost opazovanj. Obstaja tudi možnost, da se brez ogrožanja namena preskusa začasno prekine dajanje odmerkov, če bi to ublažilo bolečine ali trpljenje, ali da se zmanjša preskusni odmerek.*“

11. Podrobni napotki in razprava o načelih izbire odmerkov za študije kronične strupenosti in rakotvornosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7) ter v dveh publikacijah, ki ju je pripravil International Life Sciences Institute (22) (23). Osrednja strategija izbire odmerkov je odvisna od glavnega cilja ali ciljev študije (odstavek 6). Pri izbiri ustreznih velikosti odmerkov je treba najti ravnotežje med spremljanjem nevarnosti na eni strani ter opredeljevanjem učinkov majhnih odmerkov in njihovim pomenom na drugi. To je zlasti pomembno v primeru te kombinirane študije kronične strupenosti in rakotvornosti.

12. Razmisliti je treba o možnosti, da se namesto ločene izvedbe študije kronične strupenosti (poglavje B.30 te priloge) in študije rakotvornosti (poglavje B.32 te priloge) izvede ta kombinirana študija kronične strupenosti in rakotvornosti. S kombiniranim preskusom se v primerjavi z izvedbo dveh ločenih študij zagotovi večja učinkovitost v smislu časa in stroškov ter se nekoliko zmanjša uporaba živali, ne da bi bila pri tem ogrožena kakovost podatkov v fazi v zvezi s kronično strupenostjo ali fazi v zvezi z rakotvornostjo. Vendar je treba pri izvajanju kombinirane študije kronične strupenosti in rakotvornosti skrbno upoštevati načela izbire odmerkov (odstavki 11 in 22–26), poleg tega pa se tudi priznava, da se na podlagi nekaterih zakonodajnih okvirov lahko zahteva ločena izvedba študij. Več napotkov o tem, kako zasnovati kombinirano študijo kronične strupenosti in rakotvornosti, da bo mogoče z njo kar najbolj zmanjšati število uporabljenih živali in racionalizirati različne preskusne postopke, je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

▼M4

13. Pojmi, ki se uporabljajo v okviru te preskusne metode, so opredeljeni na koncu tega poglavja in v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

NAČELO PRESKUSA

14. Študija je zasnovana z dvema vzporednima fazama – fazo v zvezi s kronično strupenostjo in fazo v zvezi z rakotvornostjo (glede trajanja glej odstavek 34 oziroma odstavek 35). Preskusna kemikalija se navadno daje oralno, čeprav je lahko primerno tudi preskušanje z inhalacijskim ali dermalnim načinom dajanja. V fazi v zvezi s kronično strupenostjo se preskusna kemikalija dnevno v stopnjevanih odmerkih daje več skupinam preskusnih živali, in sicer ena velikost odmerka na skupino, pri čemer preskus običajno traja 12 mesecev, čeprav se lahko glede na zakonodajne zahteve izberejo tudi daljša ali krajša obdobja (glej odstavek 34). Izbrano obdobje mora biti dovolj dolgo, da se lahko pokažejo morebitni učinki kumulativne strupenosti, ne pa tudi zavajajoči učinki sprememb, povezanih s staranjem. Zasnova študije lahko vključuje tudi eno ali več vmesnih usmrtitev, npr. pri 3 ali 6 mesecih, zaradi česar se lahko vključijo dodatne skupine živali (glej odstavek 20). V fazi v zvezi z rakotvornostjo se preskusna kemikalija dnevno daje več skupinam preskusnih živali, pri čemer preskus traja večino njihove življenjske dobe. Živali je treba v obeh fazah skrbno opazovati, da se odkrijejo znaki strupenosti in nastanek neoplastičnih lezij. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in se na njih opravi obdukcija.

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

15. Ta preskusna metoda je namenjena predvsem ocenjevanju in vrednotenju kronične strupenosti in rakotvornosti pri glodavcih (odstavek 2). O uporabi vrst, ki niso glodavci, se lahko razmisli, kadar razpoložljivi podatki kažejo, da so ustreznejše za napovedovanje učinkov na zdravje ljudi. Izbiro živalske vrste je treba utemeljiti. Priporočena vrsta glodavca je podgana, čeprav se lahko uporabijo tudi druge vrste glodavcev, npr. miš. Čeprav je uporabnost miši pri preskušanju rakotvornosti lahko omejena (24) (25) (26), se lahko z nekaterimi veljavnimi zakonodajnimi ureditvami še vedno zahteva preskušanje rakotvornosti na miših, razen če se ugotovi, da taka študija z znanstvenega vidika ni nujna. Podgane in miši so najprimernejši preskusni modeli zaradi njihove razmeroma kratke življenjske dobe, razširjene uporabe v farmakoloških in toksikoloških študijah, občutljivosti za indukcijo tumorjev ter razpoložljivosti dovolj opredeljenih sevov. Zaradi teh lastnosti je na voljo veliko informacij o njihovi fiziologiji in patologiji. Kadar se zahtevajo študije kronične strupenosti/rakotvornosti na vrstah, ki niso glodavci, morata zasnova in izvajanje takih študij temeljiti na načelih, opisanih v tej preskusni metodi, ter na načelih iz poglavja B.27 te priloge z naslovom „90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodalcih“ (6). Dodatne informacije o izbiri živalske vrste in seva so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

16. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Po možnosti je treba v kombinirani študiji kronične strupenosti/rakotvornosti uporabiti isti sev in izvor živali kot v predhodnih krajših študijah strupenosti, čeprav je treba – če je znano, da se pri živalih zadevnega seva in izvora pojavljajo težave pri doseganju običajno sprejetih meril preživetja za dolgoročne študije (glej Dokument s smernicami št. 116 (7)) – razmisliti o uporabi seva živali, katerega stopnja preživetja je sprejemljiva za dolgoročno študijo. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje.

▼M4

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

17. Živali se lahko nastanijo posamično ali dajo v kletke v manjših skupinah istega spola; posamična nastanitev se lahko predvidi samo, če je znanstveno utemeljena (27) (28) (29). Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Temperatura prostora s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, mora biti cilj 50- do 60-odstotna vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Hrana mora zadovoljevati vse prehranske potrebe preskušane živalske vrste, vsebnost kontaminantov, med drugim ostankov pesticidov, obstojnih organskih onesnaževal, fitoestrogenov, težkih kovin in mikotoksinov, ki lahko vplivajo na rezultat preskusa, pa mora biti čim manjša. Redno je treba pripravljati analitske informacije o ravneh kontaminantov v hranilih in hrani, vsaj na začetku študije in kadar se zamenja serija uporabljane kemikalije, ter jih vključiti v končno poročilo. Prav tako je treba zagotoviti analitske informacije o pitni vodi, uporabljeni v študiji. Kadar se preskusna kemikalija daje s hrano, lahko na izbiro hrane vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije in zadovoljevanju prehranskih potreb živali.

Priprava živali

18. Uporabiti je treba zdrave živali, ki so se najmanj 7 dni prilagajale laboratorijskim razmeram in še niso bile vključene v preskusne postopke. V primeru glodavcev je treba odmerke začeti dajati čim prej po odstavitvi od sesanja in prilagajanju na okolje, po možnosti preden so živali stare 8 tednov. Opredeliti je treba vrsto, sev, izvor, spol, težo in starost preskusnih živali. Ob začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali za vsak spol čim manjše, njihova teža pa ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže vseh živali v študiji glede na spol. Živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Po randomizaciji med skupinami v okviru vsakega spola ne sme biti večjih razlik v povprečni telesni teži. Če obstajajo statistično pomembne razlike, je treba fazo randomizacije ponoviti, če je to mogoče. Vsaki živali je treba dodeliti edinstveno identifikacijsko številko in jo trajno označiti s to številko s tetovažo, vsaditvijo mikročipa ali drugo ustrezno metodo.

POSTOPEK

Število in spol živali

19. Uporabiti je treba oba spola. Živali mora biti dovolj za temeljito biološko in statistično ocenjevanje. Pri glodavcih mora zato vsaka odmerna skupina (kot je navedeno v odstavku 22) in sočasna kontrolna skupina, namenjena fazi študije v zvezi z rakotvornostjo, vsebovati najmanj 50 živali vsakega spola. Glede na namen študije je mogoče povečati statistično moč ključnih ocen z neenakim dodeljevanjem živali različnim odmernim skupinam, tako da je v skupinah, tretiranih z majhnimi odmerki, več kot 50 živali, npr. za ocenjevanje rakotvornega potenciala pri majhnih odmerkih. Vendar se je treba zavedati, da je ob zmernem povečanju velikosti skupine povečanje statistične moči študije razmeroma majhno. Vsaka odmerna skupina (kot je navedeno v odstavku 22) in sočasna kontrolna skupina, namenjena fazi

▼M4

študije v zvezi s kronično strupenostjo, mora v primeru glodavcev vsebovati najmanj 10 živali vsakega spola. Opozoriti je treba, da je to število manjše kot v študiji kronične strupenosti (poglavje B.30 te priloge). Vendar bo razlaga podatkov, pridobljenih z manjšim številom živali na skupino v fazi te kombinirane študije v zvezi s kronično strupenostjo, podkrepljena s podatki, pridobljenimi z večjim številom živali v fazi študije v zvezi z rakotvornostjo. V študijah, ki vključujejo miši, bodo v vsaki odmerni skupini za fazo v zvezi s kronično strupenostjo morda potrebne dodatne živali, da bo mogoče opraviti vse zahtevane hematološke preiskave. Več informacij o statistični zasnovi študije in izbiri velikosti odmerkov za čim obsežnejše povečanje statistične moči je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

Uporaba vmesnih usmrtitev, satelitske skupine in opozorilnih živali

20. Če je to znanstveno utemeljeno, se lahko v študiji predvidijo vmesne usmrtitve, npr. pri 6 mesecih za fazo v zvezi s kronično strupenostjo, da se zagotovijo informacije o napredovanju ne-neoplastičnih sprememb in mehanistične informacije. Kadar so take informacije že na voljo iz prejšnjih študij strupenosti s ponavljajočimi se odmerki v zvezi z zadevno preskusno kemikalijo, vmesne usmrtitve morda niso znanstveno utemeljene. Z živalmi, uporabljenimi v fazi študije v zvezi s kronično strupenostjo, ki običajno traja 12 mesecev (odstavek 34), se pridobijo podatki v zvezi z vmesnimi usmrtitvami za fazo študije v zvezi z rakotvornostjo, s čimer se zmanjša skupno število uporabljenih živali. V fazo študije v zvezi s kronično strupenostjo se lahko vključijo tudi satelitske skupine za spremljanje reverzibilnosti morebitnih toksikoloških sprememb, ki jih povzroči preiskovana preskusna kemikalija. Te preiskave so lahko omejene na največji odmerek v študiji in kontrolo. Po potrebi se lahko predvidi dodatna skupina opozorilnih živali (navadno 5 živali na spol) za spremljanje patološkega stanja med študijo (30). Več napotkov o tem, kako zasnovati študijo, da se vključijo vmesne usmrtitve ter satelitske in opozorilne živali, hkrati pa kar najbolj zmanjša skupno število uporabljenih živali, je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

21. Če se v zasnovo študije vključijo satelitske živali in/ali vmesne usmrtitve, število živali v vsaki odmerni skupini, vključenih v ta namen, navadno znaša 10 živali na spol, skupno število živali v zasnovi študije pa je treba povečati za toliko, kolikor se jih namerava usmrtiti pred zaključkom študije. Za živali za vmesno usmrtitev in satelitske živali so običajno potrebna enaka opazovanja kot za živali v fazi glavne študije v zvezi s kronično strupenostjo, vključno s telesno težo, porabo hrane/vode, hematološkimi in kliničnimi biokemičnimi meritvami ter patološkimi preiskavami, čeprav se lahko predvidi tudi (pri skupinah za vmesno usmrtitev), da se meritve omejijo na specifična ključna merila, kot sta nevrotoksičnost ali imunotoksičnost.

Odmerne skupine in odmerjanje

22. Napotki glede vseh vidikov izbire odmerkov in razporeditve njihovih velikosti so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7). Za fazo v zvezi s kronično strupenostjo in fazo v zvezi z rakotvornostjo je treba uporabiti najmanj tri velikosti odmerkov in sočasno kontrolo. Velikosti odmerkov navadno temeljijo na rezultatih kratkoročnejših študij s ponavljajočimi se odmerki ali študij za ugotavljanje območja, pri njihovem določanju pa je treba upoštevati vse obstoječe toksikološke in toksikokinetične podatke, ki so na voljo za preskusno kemikalijo ali sorodne snovi.

▼M4

23. Za fazo študije v zvezi s kronično strupenostjo se lahko oceni, da celotna študija s tremi velikostmi odmerkov ni potrebna, če je mogoče predvideti, da preskus pri eni velikosti odmerka, enakovredni najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, verjetno ne bo povzročil škodljivih učinkov. To predvidevanje mora temeljiti na informacijah iz predhodnih študij in preudarku, da na podlagi podatkov o strukturno sorodnih kemikalijah strupenost ni pričakovana. Lahko se uporabi meja 1 000 mg/kg telesne teže/dan, razen če izpostavljenost ljudi nakazuje potrebo po uporabi večjega odmerka.

24. Razen kadar zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ali bioloških učinkov preskusne kemikalije to ni mogoče, je treba največjo velikost odmerka izbrati za opredelitev glavnih ciljnih organov in strupenih učinkov, pri čemer se je treba izogibati povzročanju trpljenja, hude zastrupitve, obolevnosti ali smrti. Največjo velikost odmerka je praviloma treba izbrati tako, da se izzovejo znaki strupenosti, na primer upočasnitev pridobivanja telesne teže (približno 10-odstotna). Vendar se lahko glede na cilje študije (glej odstavek 6) izbere tudi največji odmerek, manjši od odmerka, ki povzroča znake strupenosti, npr. če odmerek izzove škodljiv učinek, ki vzbuja zaskrbljenost, ne vpliva pa bistveno na življenjsko dobo ali telesno težo.

25. Velikosti odmerkov in razporeditev med njimi se lahko izberejo za določanje odziva v odvisnosti od odmerka in – glede na način delovanja preskusne kemikalije – vrednosti NOAEL ali drugega želenega rezultata študije, npr. BMD (glej odstavek 27). Dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določitvi manjših odmerkov, vključujejo pričakovani naklon krivulje odmerek-odziv, odmerke, pri katerih se lahko pojavijo pomembne spremembe v presnovi ali načinu strupenega delovanja, velikost, pri kateri se pričakuje prag, ali velikost, pri kateri se pričakuje izhodiščna točka za ekstrapolacijo majhnih odmerkov. Glavni cilj kombinirane študije rakotvornosti/kronične strupenosti je pridobiti informacije za oceno tveganja za rakotvornost, informacije o kronični strupenosti pa so navadno podrejen cilj. To je treba upoštevati pri izbiri velikosti odmerkov in razporeditve med njimi za študijo.

26. Izbrana razporeditev velikosti odmerkov je odvisna od ciljev študije in lastnosti preskusne kemikalije ter je v tej preskusni metodi ni mogoče natančno predpisati, vendar dva- do štirikratni intervali velikokrat zagotovijo visoko učinkovitost preskusa pri določanju padajočih velikosti odmerkov, namesto uporabe zelo velikih intervalov (npr. večjih od faktorja približno 6–10) med odmerki pa je pogosto primerneje dodati četrto preskusno skupino. Na splošno se je treba izogibati uporabi faktorjev, večjih od 10, če se uporabijo, pa je to treba utemeljiti.

27. Kot je nadalje opisano v Dokumentu s smernicami št. 116 (7), je treba pri izbiri odmerkov upoštevati:

— znane ali domnevne nelinearnosti ali točke pregiba na krivulji odmerek-odziv,

— toksikokinetiko in odmerna območja, v katerih se pojavljajo ali ne pojavljajo presnovna indukcija, nasičenje ali nelinearnost med zunanjimi in notranjimi odmerki,

— prekurzorske lezije, označevalce učinka ali kazalnike delovanja ključnih temeljnih bioloških procesov,

▼M4

— ključne (ali domnevne) vidike načina delovanja, kot so odmerki, pri katerih se začne pojavljati citotoksičnost, so ravni hormonov motene, homeostatični mehanizmi preobremenjeni itd.,

— predele krivulje odmerek-odziv, v katerih je potrebna posebno zanesljiva ocena, npr. v območju pričakovanega BMD ali predvidenega praga,

— preudarke v zvezi s pričakovanimi stopnjami izpostavljenosti ljudi, zlasti pri izbiri srednjih in majhnih odmerkov.

28. Kontrolna skupina je netretirana skupina ali kontrolna skupina z nosilcem, če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja nosilec. Z živalmi v kontrolni skupini je treba ravnati enako kot z živalmi v preskusnih skupinah, le da se ne tretirajo s preskusno kemikalijo. Če se uporablja nosilec, mora kontrolna skupina prejeti največjo količino nosilca, ki je bila uporabljena med odmernimi skupinami. Če se preskusna snov daje s hrano in se s tem zaradi njene manjše okusnosti povzroči bistveno zmanjšanje vnosa hrane, je lahko koristna dodatna, po parih hranjena kontrolna skupina, ki se uporablja kot primernejša kontrola.

Priprava odmerkov in dajanje preskusne kemikalije

29. Preskusna kemikalija se običajno daje oralno, s hrano ali pitno vodo oziroma z gavažo. Dodatne informacije o načinih in metodah dajanja so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7). Način in metoda dajanja sta odvisna od namena študije, fizikalnih/kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, njene biološke dostopnosti ter prevladujočega načina in metode izpostavljenosti ljudi. Izbrani način in metodo dajanja je treba utemeljiti. Zaradi dobrobiti živali je treba oralno gavažo praviloma izbrati samo pri tistih snoveh, pri katerih sta ta način in metoda dajanja razumno reprezentativna za potencialno izpostavljenost ljudi (npr. pri farmacevtskih izdelkih). Prehranske in okoljske kemikalije, vključno s pesticidi, se navadno dajejo s hrano ali pitno vodo. Pri nekaterih scenarijih, npr. izpostavljenosti na delovnem mestu, pa so lahko primernejši drugi načini dajanja.

30. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Upoštevati je treba naslednje lastnosti nosilca in drugih aditivov, kot je ustrezno: učinke na absorpcijo, porazdelitev, presnovo ali retencijo preskusne kemikalije, učinke na kemijske lastnosti preskusne kemikalije, ki lahko spremenijo njene strupene lastnosti, ter učinke na porabo hrane ali vode ali na prehranjenost živali. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/emulzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih nosilcih. Pri nevodnih nosilcih morajo biti strupene lastnosti nosilca znane. Na voljo morajo biti informacije o stabilnosti preskusne kemikalije in homogenosti raztopin ali hrane (kot je ustrezno), v pogojih dajanja (npr. s hrano).

31. Pri kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Pri dolgoročnih študijah strupenosti, pri katerih se uporablja dajanje s hrano, koncentracija preskusne kemikalije v hrani praviloma ne sme presegati zgornje meje 5 % vse hrane, da se preprečijo prehranska neravnovesja. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (mg/kg hrane ali ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali (mg/kg telesne teže), ki se izračuna vsak teden. Uporabljeni način je treba navesti.

▼M4

32. V primeru oralnega dajanja živali dobivajo odmerek preskusne kemikalije vsak dan (sedem dni na teden), preskusno obdobje pa traja 12 mesecev (faza v zvezi s kronično strupenostjo) ali 24 mesecev (faza v zvezi z rakotvornostjo) – glej tudi odstavka 33 in 34. Vsak drugačen režim odmerjanja, npr. pet dni na teden, je treba utemeljiti. V primeru dermalnega dajanja so živali s preskusno kemikalijo navadno tretirane vsaj 6 ur na dan 7 dni na teden, kot je navedeno v poglavju B.9 te priloge (11), prek obdobja 12 mesecev (faza v zvezi s kronično strupenostjo) ali 24 mesecev (faza v zvezi z rakotvornostjo). Inhalacijska izpostavljenost se izvaja 6 ur na dan 7 dni na teden, uporabiti pa je mogoče tudi izpostavljenost 5 dni na teden, če je utemeljena. Obdobje izpostavljenosti praviloma traja 12 mesecev (faza v zvezi s kronično strupenostjo) ali 24 mesecev (faza v zvezi z rakotvornostjo). Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljša obdobja izpostavljenosti prilagodijo, da se kar najbolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Obdobja izpostavljenosti, krajša od 6 ur na dan, je treba utemeljiti. Glej tudi poglavje B.8 te priloge (9).

33. Če se preskusna kemikalija živalim daje z gavažo, je treba pri tem uporabljati želodčno cevko ali ustrezno intubacijsko kanilo, postopek pa opravljati vsak dan ob podobnem času. Običajno živali dobijo enkraten odmerek enkrat na dan, če pa je kemikalija na primer lokalni dražljivec, se lahko dnevno odmerjena količina ohranja tudi z dajanjem polovičnih odmerkov (dvakrat na dan). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. To količino je treba ohranjati tako majhno, kot je praktično, praviloma pa pri glodavcih ne sme preseči 1 ml/100 g telesne teže (31). Spremenljivost preskusne količine je treba kar najbolj zmanjšati s prilagajanjem koncentracije, da se zagotovi konstantna količina pri vseh velikostih odmerkov. Izjema so potencialno jedke ali dražilne kemikalije, ki jih je treba razredčiti, da se preprečijo resni lokalni učinki. Preskušanju pri koncentracijah, pri katerih obstaja verjetnost jedkosti ali dražilnosti za prebavni trakt, se je treba izogibati.

Trajanje študije

34. Obdobje odmerjanja in faza te študije v zvezi s kronično strupenostjo običajno trajata 12 mesecev, je pa ta zasnova študije taka, da se lahko uporablja tudi za kratkoročnejše (npr. 6- ali 9-mesečne) ali dolgoročnejše (npr. 18- ali 24-mesečne) študije, glede na zahteve konkretnih zakonodajnih ureditev ali za posebne mehanistične namene. Odstopanja od 12-mesečnega obdobja izpostavljenosti je treba utemeljiti, zlasti krajša obdobja. Vse odmerne skupine, dodeljene tej fazi, se ob določenem času prenehajo tretirati, da se ocenijo kronična strupenost in ne-neoplastične patološke spremembe. Satelitske skupine, vključene za spremljanje reverzibilnosti toksikoloških sprememb, ki jih povzroči preiskovana preskusna kemikalija, se s preskusno kemikalijo ne tretirajo najmanj 4 tedne in največ eno tretjino celotnega trajanja študije po koncu izpostavljenosti.

35. Faza te študije v zvezi z rakotvornostjo pri glodavcih običajno traja 24 mesecev in ustreza večini normalne življenjske dobe živali, ki bodo uporabljene. Glede na življenjsko dobo in sev živalske vrste v študiji se lahko uporabijo tudi krajša ali daljša obdobja študije, vendar je treba to utemeljiti. Za nekatere seve miši, npr. AKR/J, C3H/J ali C57BL/6J, je lahko primernejše 18-mesečno obdobje. V nadaljevanju je nekaj napotkov o trajanju in zaključku študije ter preživetju; več napotkov, vključno s preudarki o sprejemljivosti sprejemljivosti negativnih rezultatov študije rakotvornosti glede na preživetje v študiji, je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7).

▼M4

— Kadar število preživelih živali v skupinah, tretiranih z manjšimi odmerki, ali kontrolni skupini pade pod 25 %, je treba razmisliti o zaključku študije.

— Kadar zaradi strupenosti prezgodaj poginejo samo živali v skupini, tretirani z velikim odmerkom, to ne sme biti razlog za zaključek študije.

— Preživetje je treba obravnavati ločeno za vsak spol.

— Študija se ne sme podaljševati prek točke, ko razpoložljivi podatki iz študije ne zadoščajo več za statistično veljavno oceno.

OPAZOVANJA (FAZA V ZVEZI S KRONIČNO STRUPENOSTJO)

36. Vse živali je treba pregledovati za odkrivanje obolevnosti ali smrtnosti, običajno na začetku in koncu vsakega dne, vključno s konci tedna in prazniki. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka, če gre za dajanje z gavažo.

37. Podrobna klinična opazovanja je treba opraviti na vseh živalih vsaj enkrat pred prvo izpostavljenostjo (za omogočanje primerjav na istem osebku), ob koncu prvega tedna študije, zatem pa mesečno. Protokol za opazovanja je treba določiti tako, da so razlike med posameznimi opazovalci čim manjše in neodvisne od preskusne skupine. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj kletk, v katerih bivajo živali, po možnosti na standardnem mestu in vedno ob istem času. Opažanja je treba skrbno zabeležiti, po možnosti s sistemi točkovanja, ki jih izrecno določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da se pogoji opazovanja čim manj spreminjajo. Pozornost je med drugim treba nameniti vsem spremembam na koži, kožuhu, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenju, piloerekciji, velikosti zenic, nenavadnemu vzorcu dihanja). Prav tako je treba zabeležiti spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipij (npr. prekomernega čiščenja, ponavljajočega se vrtenja v krogu) ali nenormalnega vedenja (npr. samopohabe, vzvratne hoje) (32).

38. Na vseh živalih je treba pred prvim dajanjem preskusne kemikalije z oftalmoskopom ali drugo primerno opremo opraviti oftalmološko preiskavo. Ob koncu študije je treba to preiskavo po možnosti opraviti na vseh živalih, vsekakor pa vsaj pri skupini, tretirani z velikim odmerkom, in kontrolni skupini. Če se v očeh zaznajo spremembe, povezane s tretiranjem, je treba pregledati vse živali. Če strukturna analiza ali druge informacije kažejo na strupenost za oči, je treba pogostnost preiskav oči povečati.

39. Za kemikalije, v zvezi s katerimi je predhodni 28- in/ali 90-dnevni preskus strupenosti s ponavljajočimi se odmerki nakazal potencial za povzročanje nevrotoksičnih učinkov, se lahko po izbiri ocenijo senzorične reakcije na različne vrste dražljajev (32) (npr. slušne, vidne in proprioceptivne dražljaje) (33) (34) (35), moč oprijema (36) ter motorična aktivnost (37), in sicer pred začetkom študije ter vsake 3 mesece po začetku študije do 12. meseca in vključno z njim, pa tudi ob koncu študije (če je daljša od 12 mesecev). Nadaljnje podrobnosti glede mogočih postopkov so na voljo v navedenih virih. Uporabiti je mogoče tudi druge postopke, ki v njih niso opisani.

▼M4

40. Za kemikalije, v zvezi s katerimi je predhodni 28- in/ali 90-dnevni preskus strupenosti s ponavljajočimi se odmerki nakazal potencial za povzročanje imunotoksičnih učinkov, se lahko nadaljnje preiskave te končne točke po izbiri opravijo ob koncu študije.

Telesna teža, poraba hrane/vode in izkoristek hrane

41. Vse živali je treba stehtati na začetku tretiranja, vsaj enkrat na teden prvih 13 tednov, zatem pa najmanj enkrat na mesec. Meritve porabe in izkoristka hrane je treba prvih 13 tednov opravljati vsaj enkrat na teden, nato pa najmanj enkrat na mesec. Kadar se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba porabo vode prvih 13 tednov meriti vsaj enkrat na teden, zatem pa najmanj enkrat na mesec. O meritvah porabe vode je treba razmisliti tudi pri študijah, pri katerih se spremenijo vzorci pitja.

Hematologija in klinična biokemija

42. V študijah z glodavci je treba hematološke preiskave opravljati na vseh živalih v študiji (10 samcih in 10 samicah na skupino), in sicer pri 3, 6 in 12 mesecih, pa tudi ob koncu študije (če je daljša od 12 mesecev). Pri miših so lahko za izvedbo vseh zahtevanih hematoloških preiskav potrebne satelitske živali (glej odstavek 19). V študijah na vrstah, ki niso glodavci, se vzorci jemljejo manjšemu številu živali (npr. 4 živalim na spol na skupino v študijah s psi) ob vmesnih vzorčenjih in ob koncu študije, kot je opisano za glodavce. Meritev pri 3 mesecih, pa naj gre za študije z glodavci ali vrstami, ki niso glodavci, ni treba opraviti, če v predhodni 90-dnevni študiji, izvedeni s primerljivimi velikostmi odmerkov, niso bili opaženi učinki na hematološke parametre. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu, na primer s punkcijo srca ali iz retroorbitalnega sinusa, medtem ko je žival v anesteziji.

43. Preiskati je treba naslednji seznam parametrov (38): skupno in diferencialno število levkocitov, število eritrocitov, število trombocitov, koncentracijo hemoglobina, hematokrit (volumen stisnjenih eritrocitov), povprečni volumen eritrocitov (MCV), povprečno količino hemoglobina v eritrocitih (MCH), povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitih (MCHC), protrombinski čas in aktivirani parcialni tromboplastinski čas. Glede na strupenost preskusne kemikalije se lahko, kot je primerno, merijo tudi drugi hematološki parametri, kot so Heinzeva telesca ali druge netipične morfološke oblike eritrocitov ali methemoglobin. Na splošno je treba sprejeti prožni pristop glede na opažene in/ali pričakovane učinke dane preskusne kemikalije. Če preskusna kemikalija učinkuje na krvotvorni sistem, sta lahko indicirana tudi meritev števila retikulocitov in citološka preiskava kostnega mozga, čeprav teh ni treba izvajati redno.

44. Klinične biokemične preiskave za ugotavljanje glavnih strupenih učinkov na tkiva ter zlasti ledvice in jetra je treba opravljati na vzorcih krvi, odvzetih vsem živalim v študiji (10 samcem in 10 samicam na skupino) v istih časovnih intervalih, kot so določeni za hematološke preiskave. Pri miših so lahko za izvedbo vseh zahtevanih kliničnih biokemičnih preiskav potrebne satelitske živali. V študijah na vrstah, ki niso glodavci, se vzorci jemljejo manjšemu številu živali (npr. 4 živalim na spol na skupino v študijah s psi) ob vmesnih vzorčenjih in ob koncu študije, kot je opisano za glodavce. Meritev pri 3 mesecih, pa naj gre za študije z glodavci ali vrstami, ki niso glodavci, ni treba opraviti, če v predhodni 90-dnevni študiji,

▼M4

izvedeni s primerljivimi velikostmi odmerkov, niso bili opaženi učinki na klinične biokemične parametre. Pred odvzemom vzorcev krvi je priporočljivo živali čez noč postiti (kar pa ne velja za miši) ([1]). Preiskati je treba naslednji seznam parametrov (38): glukozo, sečnino (sečninski dušik), kreatinin, skupne beljakovine, albumin, kalcij, natrij, kalij, skupni holesterol, najmanj dva ustrezna preskusa za hepatocelularno oceno (alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, glutamat-dehidrogenaza, skupne žolčne kisline) (39) in najmanj dva ustrezna preskusa za hepatobiliarno oceno (alkalna fosfataza, γ-glutamil transferaza, 5'-nukleotidaza, skupni bilirubin, skupne žolčne kisline) (39). Glede na strupenost preskusne kemikalije se lahko, kot je primerno, merijo tudi drugi klinični kemični parametri, kot so vrednost trigliceridov na tešče, specifični hormoni in holinesteraza. Na splošno je potreben prožni pristop glede na opažene in/ali pričakovane učinke dane preskusne kemikalije.

45. Analize urina je treba opravljati na vseh živalih v študiji (10 samcih in 10 samicah na skupino) na vzorcih, zbranih v istih časovnih intervalih kot pri hematoloških in kliničnih kemičnih preiskavah. Meritev pri 3 mesecih ni treba opraviti, če v predhodni 90-dnevni študiji, izvedeni s primerljivimi velikostmi odmerkov, niso bili opaženi učinki pri analizi urina. V strokovno priporočilo glede kliničnih patoloških študij (38) je bil vključen naslednji seznam parametrov: videz, količina, osmolalnost ali specifična teža, pH, skupne beljakovine in glukoza. Druge določitve vključujejo keton, urobilinogen, bilirubin in okultno kri. Če je treba preiskavo opaženih učinkov razširiti, se lahko uporabijo dodatni parametri.

46. Na splošno se šteje, da je v študijah s psi pred tretiranjem treba določiti izhodiščne hematološke in klinične biokemične spremenljivke, v študijah z glodavci pa to ni potrebno (38). Če pa so pretekli izhodiščni podatki (glej odstavek 58) nezadostni, je treba razmisliti o pripravi takih podatkov.

PATOLOGIJA

Makroskopska obdukcija

47. Praviloma se na vseh živalih v študiji opravi popolna in natančna makroskopska obdukcija, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Lahko pa se tudi predvidi (za skupine za vmesno usmrtitev ali satelitske skupine), da se meritve omejijo na specifična ključna merila, kot sta nevrotoksičnost ali imunotoksičnost (glej odstavek 21). Obdukcija in poznejši postopki, opisani v naslednjih odstavkih, pri teh živalih niso potrebni. Za opozorilne živali je lahko obdukcija potrebna v posameznih primerih, o čemer odloča vodja študije.

([1]) Za številne preiskave seruma in plazme, zlasti za določanje glukoze, se priporoča postenje čez noč. Glavni razlog za to je, da bi povečana spremenljivost, ki bi se zagotovo pojavila, če se žival ne bi postila, lahko prikrila manj opazne učinke in otežila razlago. Vendar je treba opozoriti, da lahko postenje čez noč spremeni splošni metabolizem živali in lahko zlasti pri študijah prehranjevanja povzroči motnje v dnevni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Vse živali je treba ocenjevati v enakem fiziološkem stanju, zato se podrobne ali nevrološke ocene po možnosti izvedejo drug dan kot jemanje vzorcev za klinične biokemične preiskave.

▼**M4**

48. Stehtati je treba organe vseh živalih, razen tistih, ki se izključijo na podlagi zadnjega dela odstavka 47. Z nadledvičnih žlez, možganov, nadmodka, srca, ledvic, jeter, jajčnikov, vranice, mod, ščitnice (stehtane po fiksaciji skupaj z obščitnicami) in maternice vseh živali (razen živali, ki so bile najdene umirajoče in/ali so bile usmrčene med študijo) je treba, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato izmeriti njihovo mokro težo čim prej po disekciji, da se ne izsušijo.

49. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo (40) (tkiva v oglatih oklepajih niso obvezna):

vse vidne lezije	srce	trebušna slinavka	želodec (predželodec, žlezni želodec)
nadledvična žleza	vito črevo	obščitnica	[zobje]
aorta	tešče črevo	periferni živec	modo
možgani (vključno z rezinami velikih in malih možganov ter podaljšane hrbtenjače/ mosta)	ledvica	hipofiza	priželjc
slepo črevo	solzna žleza (zunaj očesne votline)	prostata	ščitnica
maternični vrat	jetra	rektum	[jezik]
koagulacijska žleza	pljuča	žleza slinavka	sapnik
debelo črevo	bezgavke (povrhnje in globoke)	semenski mešiček	sečni mehur
dvanajsternik	mlečna žleza (obvezna za samice, in če jo je mogoče secirati s prostim očesom, za samce)	skeletna mišica	maternica (vključno z vratom)
nadmodek	[zgornja dihala, vključno z nosom, nosnimi školjkami in obnosnimi votlinami]	koža	[sečevod]
oko (vključno z mrežnico)	požiralnik	hrbtenjača (na treh ravneh: vratni, prsni in ledveni)	[sečnica]
[stegnenica s sklepom]	[vohalni betič]	vranica	vagina
žolčnik (pri vrstah, ki niso podgane)	jajčnik	[prsnica]	rezina in/ali svež punktat kostnega mozga
Harderjeva žleza			

▼M4

Pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba shraniti oba organa. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije. V študijah z dermalnim načinom dajanja je treba pregledati iste organe, kot so določeni na seznamu za oralni način, potrebno pa je posebno vzorčenje in shranjevanje kože z mesta nanosa. V inhalacijskih študijah je treba v zvezi s seznamom shranjenih in pregledanih tkiv dihal slediti priporočilom iz poglavij B.8 (9) in B.29 te priloge (10). Za druge organe/tkiva (in poleg posebej shranjenih tkiv dihal) je treba preučiti seznam organov, določen za oralni način dajanja.

Histopatologija

50. Na voljo so napotki o najboljših praksah pri izvajanju toksikoloških patoloških študij (40). Histopatološke preiskave morajo obsegati vsaj:

— vsa tkiva živali iz skupine, tretirane z velikim odmerkom, in kontrolne skupine,

— vsa tkiva živali, ki so poginile ali bile usmrčene med študijo,

— vsa tkiva, ki kažejo makroskopske abnormalnosti,

— ciljna tkiva ali tkiva, pri katerih so bile v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opažene s tretiranjem povezane spremembe, vseh živali iz vseh drugih odmernih skupin,

— pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba pregledati oba organa.

OPAZOVANJA (FAZA V ZVEZI Z RAKOTVORNOSTJO)

51. Vse živali je treba pregledovati za odkrivanje obolevnosti ali smrtnosti, običajno na začetku in koncu vsakega dne, vključno s konci tedna in prazniki. Poleg tega je treba živali pregledati enkrat na dan za odkrivanje konkretnih toksikološko pomembnih znakov. Pri študijah, v katerih se uporabi gavaža, je treba živali pregledati takoj po vnosu odmerka. Posebno pozornost je treba nameniti nastanku tumorjev ter zabeležiti čas nastopa, mesto, mere, videz in progresijo vsakega makroskopsko vidnega ali otipljivega tumorja.

52. Vse živali je treba stehtati na začetku tretiranja, vsaj enkrat na teden prvih 13 tednov, zatem pa najmanj enkrat na mesec. Meritve porabe in izkoristka hrane je treba prvih 13 tednov opravljati vsaj enkrat na teden, nato pa najmanj enkrat na mesec. Kadar se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba porabo vode prvih 13 tednov meriti vsaj enkrat na teden, zatem pa najmanj enkrat na mesec. O meritvah porabe vode je treba razmisliti tudi pri študijah, pri katerih se spremenijo vzorci pitja.

▼M4

Hematološke, klinične biokemične in druge meritve

53. Da bi se s študijo pridobilo kar največ informacij, zlasti kar zadeva razmisleke o načinu delovanja, se lahko jemljejo vzorci krvi za hematološke in klinične biokemične preiskave, čeprav o tem odloča vodja študije. Primerna je lahko tudi analiza urina. Informacije o teh parametrih se zagotovijo s podatki, ki so bili pridobljeni z živalmi, uporabljenimi v fazi študije v zvezi s kronično strupenostjo, ki običajno traja 12 mesecev (odstavek 34). Več napotkov o vrednosti jemanja takih vzorcev v okviru študije rakotvornosti je na voljo v Dokumentu s smernicami št. 116 (7). Če se odvzamejo vzorci krvi, je treba to storiti ob koncu preskusnega obdobja, tik pred postopkom usmrtitve živali ali v okviru tega postopka. Odvzeti jih je treba na imenovanem mestu, na primer s punkcijo srca ali iz retroorbitalnega sinusa, medtem ko je žival v anesteziji. Za pregled se lahko pripravijo tudi krvni razmazi, zlasti če kaže, da je ciljni organ kostni mozeg, čeprav so bili izraženi dvomi o vrednosti takega pregleda krvnih razmazov v fazi v zvezi z rakotvornostjo za ocenjevanje rakotvornega/onkogenega potenciala (38).

PATOLOGIJA

Makroskopska obdukcija

54. Na vseh živalih v študiji, razen na opozorilnih in drugih satelitskih živalih (glej odstavek 20), se opravi popolna in natančna makroskopska obdukcija, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Za opozorilne in druge satelitske živali je lahko obdukcija potrebna v posameznih primerih, o čemer odloča vodja študije. Tehtanje organov navadno ni del študije rakotvornosti, saj je zaradi sprememb, povezanih s staranjem, v poznejših fazah pa zaradi nastanka tumorjev, lahko motena koristnost podatkov o teži organov. So pa lahko ti podatki odločilni za oceno zanesljivosti dokazov in zlasti za preudarke v zvezi z načinom delovanja. Če je teža organov del satelitske študije, jo je treba izmeriti najpozneje eno leto po začetku študije.

55. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo (40) (tkiva v oglatih oklepajih niso obvezna):

vse vidne lezije	srce	trebušna slinavka	želodec (predželodec, žlezni želodec)
nadledvična žleza	vito črevo	obščitnica	[zobje]
aorta	tešče črevo	periferni živec	modo
možgani (vključno z rezinami velikih in malih možganov ter podaljšane hrbtenjače/mosta)	ledvica	hipofiza	priželjc
slepo črevo	solzna žleza (zunaj očesne votline)	prostata	ščitnica
maternični vrat	jetra	danka	[jezik]
koagulacijska žleza	pljuča	žleza slinavka	sapnik
debelo črevo	bezgavke (povrhnje in globoke)	semenski mešiček	sečni mehur

▼**M4**

dvanajsternik	mlečna žleza (obvezna za samice, in če jo je mogoče secirati s prostim očesom, za samce)	skeletna mišica	maternica (vključno z vratom)
nadmodek	[zgornja dihala, vključno z nosom, nosnimi školjkami in obnosnimi votlinami]	koža	[sečevod]
oko (vključno z mrežnico)	požiralnik	hrbtenjača (na treh ravneh: vratni, prsni in ledveni)	[sečnica]
[stegnenica s sklepom]	[vohalni betič]	vranica	vagina
žolčnik (pri vrstah, ki niso podgane)	jajčnik	[prsnica]	rezina in/ali svež punktat kostnega mozga
Harderjeva žleza			

Pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba shraniti oba organa. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije. V študijah z dermalnim načinom dajanja je treba pregledati iste organe, kot so določeni na seznamu za oralni način, potrebno pa je posebno vzorčenje in shranjevanje kože z mesta nanosa. V inhalacijskih študijah je treba v zvezi s seznamom shranjenih in pregledanih tkiv dihal slediti priporočilom iz poglavij B.8 (8) in B.29 te priloge (9). Za druge organe/tkiva (in poleg posebej shranjenih tkiv dihal) je treba preučiti seznam organov, določen za oralni način dajanja.

Histopatologija

56. Na voljo so napotki o najboljših praksah pri izvajanju toksikoloških patoloških študij (40). Pregledati je treba vsaj naslednja tkiva:

— vsa tkiva živali iz skupine, tretirane z velikim odmerkom, in kontrolne skupine,

— vsa tkiva živali, ki so poginile ali bile usmrčene med študijo,

— vsa tkiva, ki kažejo makroskopske abnormalnosti, vključno s tumorji,

— kadar so bile v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opažene s tretiranjem povezane histopatološke spremembe, je treba pregledati ista tkiva vseh živali iz vseh drugih odmernih skupin,

— pri parnih organih, npr. ledvicah ali nadledvičnih žlezah, je treba pregledati oba organa.

▼M4

PODATKI IN POROČANJE (FAZA V ZVEZI Z RAKOTVORNOSTJO IN FAZA V ZVEZI S KRONIČNO STRUPENOSTJO)

Podatki

57. Navesti je treba podatke za posamezne živali za vse ocenjevane parametre. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navede število živali na začetku preskusa, število živali, ki so bile med preskusom najdene poginule ali so bile usmrčene iz humanih razlogov, in čas vsake smrti ali humane usmrtitve, število živali, ki kažejo znake strupenosti, opis opaženih znakov zastrupitve, vključno s časom njihovega nastopa, trajanjem in resnostjo vseh strupenih učinkov, ter število živali, pri katerih so opažene lezije, vrste lezij in odstotek živali, pri katerih je opažena posamezna vrsta lezije. V preglednicah s povzetimi podatki je treba navesti srednje vrednosti in standardne odklone (za preskusne podatke, ki se nenehno zbirajo) za živali, pri katerih so opaženi strupeni učinki ali lezije, ter razvrstitev lezij.

58. Pretekli kontrolni podatki so lahko dragoceni za razlago rezultatov študije, npr. kadar obstajajo znaki, da podatki, zagotovljeni s sočasnimi kontrolami, bistveno odstopajo od nedavnih podatkov, pridobljenih na kontrolnih živalih iz istega preskuševalnega laboratorija/kolonije. Če se ocenjujejo pretekli kontrolni podatki, morajo izhajati iz istega laboratorija, se nanašati na živali iste starosti in seva, poleg tega pa morajo biti pridobljeni v petih letih pred zadevno študijo.

59. Če je ustrezno, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Statistične metode in podatke, ki bodo analizirani, je treba izbrati pri zasnovi študije (odstavek 9). V izbiri je treba predvideti prilagoditve glede na preživetje, če so potrebne.

60. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijske podatke,

— izvor kemikalije,

— številko serije,

— potrdilo o kemijski analizi.

Nosilec (če je ustrezno)

— utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda).

Preskusne živali

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev izbire,

— število, starost in spol živali na začetku preskusa,

— izvor, nastanitvene pogoje, hrano itd.,

— težo vsake živali ob začetku preskusa.

▼M4

Preskusni pogoji

— utemeljitev načina dajanja in izbire odmerkov,

— če je ustrezno, uporabljene statistične metode za analizo podatkov,

— podatke o formulaciji preskusne kemikalije/pripravi hrane,

— analitske podatke o doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka,

— način dajanja in podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— za inhalacijske študije informacijo, ali je bila uporabljena izpostavljenost nosu ali izpostavljenost celega telesa,

— dejanske odmerke (mg/kg telesne teže/dan) in faktor za pretvorbo koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (mg/kg ali ppm) v dejanski odmerek, če je primerno,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

Rezultati (predstaviti je treba povzete podatke v preglednicah in podatke za posamezne živali)

Splošno

— podatke o preživetju,

— telesno težo/spremembe telesne teže,

— porabo hrane, izračune izkoristka hrane, če so bili narejeni, in porabo vode, če je ustrezno,

— toksikokinetične podatke, če so na voljo,

— oftalmoskopiranje (če so podatki na voljo),

— hematologijo (če so podatki na voljo),

— klinično kemijo (če so podatki na voljo).

Klinični izsledki

— znake zastrupitve,

— pojavnost (in resnost, če se ocenjuje) vseh abnormalnosti,

— vrsto, resnost in trajanje kliničnih opažanj (prehodnih ali trajnih).

Obdukcijski podatki

— terminalno telesno težo,

— težo organov in razmerja med težami organov, če je ustrezno,

— izsledke obdukcije; pojavnost in resnost abnormalnosti.

Histopatologija

— neneoplastične ugotovitve histopatoloških preiskav,

— neoplastične ugotovitve histopatoloških preiskav,

▼M4

— povezanost makroskopskih in mikroskopskih ugotovitev,

— podroben opis vseh s tretiranjem povezanih ugotovitev histopatoloških preiskav, vključno z razvrstitvami resnosti,

— navedbo morebitnih medsebojnih strokovnih pregledov mikroskopskih preparatov.

Statistična obdelava rezultatov, če je ustrezno

Razprava o rezultatih

— razpravo o pristopih modeliranja,

— razmerja med odmerkom in odzivom,

— pretekle kontrolne podatke,

— preučitev vseh informacij o načinu delovanja,

— določitev BMD, NOAEL ali LOAEL,

— pomembnost za ljudi.

Sklepi.

VIRI:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rim, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Pariz.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

(3) Combes, R. D., Gaunt, I., Balls, M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

(4) Barlow, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., idr. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

(5) Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

(6) Poglavje B.27 te priloge, Preskus subkronične oralne toksičnosti: 90-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na neglodalcih.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druga izdaja. Series on Testing and Assessment No. 116, na voljo na javni spletni strani OECD o smernicah za preskušanje na naslovu www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

(9) Poglavje B.8 te priloge, Subakutna strupenost pri vdihavanju: 28-dnevna študija.

(10) Poglavje B.29 te priloge, Subkronična strupenost pri vdihavanju: 90-dnevna študija.

(11) Poglavje B.9 te priloge, Strupenost (v stiku s kožo) pri ponavljajočem se odmerku (28 dni).

▼M4

(12) Boobis, A. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M. E., Vickers, C., Willcocks, D., Farland, W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793–801.

(13) Cohen, S. M., Meek, M. E., Klaunig, J. E., Patton, D. E., Fenner-Crisp, P. A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581–589.

(14) Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. N., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., Dragan, Y. P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51–56.

(15) Meek, E. M., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKemmon, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D. E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591–653.

(16) Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R., idr. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

(17) Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T., idr. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

(18) Doe, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A., idr. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

(19) Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M., idr. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Pariz.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariz.

(22) Rhomberg, L. R., Baetcke, K., Blancato, J., Bus, J., Cohen, S., Conolly, R., Dixit, R., Doe, J., Ekelman, K., Fenner-Crisp, P., Harvey, P., Hattis, D., Jacobs, A., Jacobson-Kram, D., Lewandowski, T., Liteplo, R., Pelkonen, O., Rice, J., Somers, D., Turturro, A., West, W., Olin, S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran, J. A. (ur.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths, S. A., Parkinson, C., McAuslane, J. A. N., in Lumley, C. E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

(25) Usui, T., Griffiths, S. A., in Lumley, C. E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. V: D'Arcy POF & Harron DWG (ur.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. str. 279–284.

(26) Carmichael, N. G., Enzmann, H., Pate, I., Waechter, F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105: 1196–1203.

▼M4

(27) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, december, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21: 15–23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

(34) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health 9: 691–704.

(35) Moser, V. C., McDaniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

(36) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

(37) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

(38) Weingand, K., Brown, G., Hall, R., idr. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(39) (Osnutek) dokumenta agencije EMEA z naslovom „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman, J. W., Goodman, D. G., Hildebrandt, P. K., idr. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼B

B.34 PRESKUS STRUPENOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE NA ENI GENERACIJI

1. METODA

1.1 UVOD

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se daje dnevno, v graduiranih odmerkih, nekaj skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke med rastjo in tekom najmanj enega zaključenega cikla spermatogeneze (približno 56 dni pri miših in 70 dni pri podganah), da bi preskusna snov lahko povzročila škodljive učinke na spermatogenezo.

Samicam iz starševske generacije (P) je treba odmerke dajati tekom najmanj dveh zaključenih pojatvenih ciklusov, da bi preskusna snov lahko povzročila škodljive učinke na pojatev. Živali se potem parijo. Preskusna snov se daje obema spoloma v času parjenja, pozneje pa samo še samicam v času brej osti in dokler traja dojenje. Za dajanje z inhalacijo je treba metodo prilagoditi.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Jih ni.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 *Priprave*

Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine. Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Preskusno snov je priporočljivo dajati s hrano ali v pitni vodi. Sprejemljivi so tudi drugi načini dajanja. Vsem živalim je treba dajati odmerke z enako metodo v ustreznem preskusnem obdobju. Če se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec ali drugi dodatki, se je treba prepričati, da le-ti ne povzročajo strupenih učinkov. Odmerke je treba dajati sedem dni na teden.

▼B

1.6.2 Preskusne živali

Izbor vrst

Priporočeni vrsti sta miš in podgana. Uporabiti je treba zdrave živali, ki niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Sevi z nizko plodnostjo naj se ne uporabljajo. Preskusne živali je treba opredeliti po vrsti, sevu, spolu, teži in/ali starosti.

Za ustrezno oceno plodnosti je treba preučiti samce in samice. Vse preskusne in kontrolne živali je treba odstaviti od sesanja pred začetkom dajanja odmerkov.

Število in spol

Vsaka preskusna in kontrolna skupina naj ima zadostno število živali, da bo pri ali tik pred rokom skotitve vsebovala okrog 20 brejih samic.

Cilj je ustvariti zadosti primerov brej osti in mladičev, s čimer se zagotovi pomenljiva ocena zmožnosti učinkovanja snovi na plodnost, brej ost in materinsko vedenje v starševski P generaciji živali, ter na sesanje, rast in razvoj mladičev F1 od zaploditve do odstavitve od sesanja.

1.6.3 Preskusni pogoji

Hrano in vodo je treba priskrbeti ad libitum. Ko se bliža kotitev, je treba breje samice razvrstiti po materinskih kletkah ali kletkah za kotitev posamezno ter priskrbeti material za izdelavo gnezda.

1.6.3.1 Velikosti odmerka

Uporabiti je treba najmanj tri preskusne in eno kontrolno skupino. Če je pri dajanju preskusne snovi uporabljen nosilec, naj bi kontrolna skupina prejela nosilec v največji uporabljeni velikosti. Če preskusna snov povzroči manjši vnos ali izkoristek hrane, potem bi bila lahko potrebna uporaba paralelne kontrolne skupine za hrano. V najboljšem primeru najvišja velikost odmerka, razen če je ne omejujejo fizikalne/kemijske lastnosti ali biološki učinki preskusne snovi, povzroči strupenost, vendar ne smrtnosti, pri starševskih (P) živalih. Srednja velikost ali velikosti odmerka naj povzročijo minimalne strupene učinke, ki se jih lahko pripiše preskusni snovi, nizek odmerek pa ne bi sme povzročiti nikakršnih vidnih škodljivih učinkov na starših ali potomcih. Kadar se odmerek posameznim živalim daje z gavažo ali s kapsulo, ga je treba odmeriti na podlagi telesne mase posamezne živali in tedensko prilagajati spremembam telesne mase. Pri samicah v času brej osti lahko odmerki temeljijo na telesni masi na dan brej osti 0 ali 6, če je tako želeno.

1.6.3.2 Mejni preskus

V primeru snovi nizke strupenosti, kadar velikost odmerka najmanj 1 000 mg/kilogram ne povzroči nikakršnih znakov motenja razmnoževanja, študije pri drugih velikostih odmerka verjetno ne bodo potrebne. Če predhodna študija pri visoki velikosti odmerka z jasnimi znaki maternalne strupenosti ne pokaže nikakršnih škodljivih učinkov na plodnost, študije pri drugih velikosti odmerka verjetno ne bodo potrebne.

▼B

1.6.3.3 *Izvajanje preskusa*

Časovni razpored preskusa

Vsakodnevno dajanje odmerkov starševskim (P) samcem naj se začne pri starosti okrog pet do devet tednov, potem ko so že najmanj pet dni odstavljeni od sesanja in prilagojeni preskusnim pogojem. Pri podganah se dajanje odmerkov nadaljuje 10 tednov pred obdobjem parjenja (osem tednov pri miših). Samce je treba usmrtiti in pregledati ali na koncu obdobja parjenja ali pa se lahko ohranijo na preskusni hrani za morebitno produkcijo drugega zaroda in se usmrtijo in pregledajo enkrat pred koncem študije. Pri starševskih (P) samicah se dajanje odmerkov začne najmanj po petih dneh prilagajanja preskusnim pogojem in se nadaljuje najmanj dva tedna pred parjenjem. Vsakodnevno dajanje odmerkov starševskim samicam naj se nadaljuje še skozi tritedensko obdobje parjenja, brej osti in vse do odstavitve od sesanja mladičev F1. Upoštevati je treba spremembe časovnega razporeda dajanja odmerkov, utemeljenega na drugih razpoložljivih informacijah o preskusni snovi, kot je indukcija metabolizma ali bioakumulacije.

Postopek parjenja

Pri preskusih strupenosti za razmnoževanje je mogoče uporabiti parjenje v razmerju ali 1:1 (en samec na eno samico) ali 1:2 (en samec na dve samici).

Pri parjenju 1:1 se samica nastani z istim samcem vse do spočetja ali dokler ne potečejo trije tedni. Vsako jutro se samice pregledajo za prisotnost semenčec ali vaginalnih zamaškov. Dan 0 brejosti je dan, ko se odkrije vaginalni zamašek ali semenčeca.

Tiste pare, ki se ne uspejo spariti, je treba preučiti, da bi se določil vzrok navidezne neplodnosti.

To lahko zajema postopke, kot so omogočanje dodatnih priložnosti za parjenje z drugimi dokazanimi očeti samci ali materami samicami, mikroskopski pregledi razmnoževalnih organov in pregled pojatvenega ciklusa ali spermatogeneze.

Velikosti zaroda

Živalim, ki jim je dan odmerek med študijo plodnosti, se omogoči, da skotijo na normalen način in vzredijo svoje mladiče do odstavitve od sesanja brez standardiziranja zarodov.

Kjer se opravi standardizirane zaroda, se predlaga naslednji postopek. V času od prvega do četrtega dne po skotitvi se lahko velikost vsakega zaroda prilagodi z izločitvijo odvečnih mladičev, da bi se dobilo, če je to mogoče, štiri samce in štiri samice na zarod.

Kadar število mladih samcev in samic ne omogoča, da bi jih v vsakem zarodu bilo po štiri na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer, pet samcev in tri samice). Prilagoditve se ne uporabljajo za primer zarodov z manj kot osmimi mladiči.

▼B

1.6.4 Opazovanja

Tekom celotnega preskusnega obdobja je treba žival opazovati najmanj enkrat dnevno. Ustrezne vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake strupenosti, vključno s smrtnostjo, je treba zabeležiti. V obdobju pred in med parjenjem je treba vsak dan meriti porabo hrane. Po kotitvi in v času dojenja je treba merjenje porabe hrane (hkrati z merjenjem porabe vode, kadar se preskusna snov daje s pitno vodo) meriti na isti dan, kot se tehta zarod. Starševske samce in samice je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, potem pa enkrat tedensko. O navedenih opazovanjih je treba poročati za vsako odraslo žival posebej.

Trajanje brej osti je treba računati od dneva 0 brej osti. Vsak zarod je treba pregledati čim prej po skotitvi, da bi se določilo število in spol mladičev, mrtvorojene in živorojene živali ter prisotnost vidnih anomalij.

Mrtve mladiče in mladiče, žrtvovane na četrti dan, je treba shraniti in preučiti glede možnih okvar. Žive mladiče je treba prešteti in zarode stehtati na jutro po skotitvi, četrti in sedmi dan ter potem še enkrat tedensko do zaključka študije, ko je treba živali stehtati posamezno.

Zabeležiti je treba fizične in vedenjske abnormalnosti, opažene na materah samicah ali mladičih.

1.6.5 Patologija

1.6.5.1 Nekropsija

Ob žrtvovanju ali smrti med študijo je treba na živalih iz starševske generacije opraviti makroskopski pregled, da bi se odkrile vse strukturalne abnormalnosti ali patološke spremembe, pri čemer se posebno pozornost posveti na razmnoževalnemu sistemu. Mrtve ali umirajoče mladiče je treba pregledati, da bi se odkrile okvare.

1.6.5.2 Histopatologija

Jajčnike, maternico, maternični vrat, vagino, moda, obmodke, semenjake, prostato, sprednji reženj prostate, hipofizo in ciljne organe vseh starševskih živali je treba shraniti za mikroskopski pregled. V primeru, da ti organi niso bili pregledani v drugih študijah z večkratnimi odmerki, jih je treba, kadar je to izvedljivo, mikroskopsko pregledati na vseh živalih iz skupine z visokim odmerkom in kontrolne skupine ter na živalih, ki so umrle med študijo.

Organe, ki na navedenih živalih pokažejo abnormalnosti, je treba potem pregledati še na vseh ostalih starševskih živalih. V teh primerih je treba opraviti mikroskopski pregled vseh tkiv, ki kažejo vidne patološke spremembe. Kot je bilo predlagano v okviru postopkov parjenja, se mikroskopskemu pregledu lahko izpostavijo razmnoževalni organi živali, pri katerih se sumi neplodnost.

▼B

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število plodnih samcev, število brejih samic, tipe sprememb in odstotek živali, ki kažejo določen tip spremembe.

Kadar je to mogoče, je treba numerične rezultate oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— uporabljena vrsta/sev,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku, vključno z rodnostjo, brej ostjo in sposobnostjo preživetja,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do načrtovanega žrtvovanja ali do zaključka študije,

— tabela, na kateri so prikazane teže vsakega zaroda, povprečne teže mladičev ter posamezne teže mladičev na zaključku,

— strupeni ali drugi učinki na razmnoževanje, mladiče in poporodni rasti,

— dan opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o telesni masi starševskih živali,

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh mikroskopskih ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je to mogoče,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 OCENA IN RAZLAGA

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

▼B

B.35 **ŠTUDIJA DVOGENERACIJSKE REPRODUKTIVNE STRUPENOSTI**

1. **METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 416 (2001).

1.1 UVOD

Ta metoda za preskušanje dvogeneracijske reprodukcije je namenjena zagotavljanju splošnih informacij o učinkih preskusne snovi na celovitost in zmogljivost moških in ženskih reproduktivnih sistemov, vključno s funkcijo spolnih žlez, ciklom estrusa, obnašanjem pri parjenju, spočetjem, brej ostjo, kotitvijo, laktacijo in odstavljanjem, ter na rast in razvoj potomcev. Študija lahko zagotovi tudi informacije o učinkih preskusne snovi na neonatalno obolevnost, smrtnost in predhodne podatke o strupenosti za razvoj pred rojstvom in po njem ter služi kot vodnik za nadaljnje preskuse. Poleg preučevanja rasti in razvoja generacije F1 je ta preskusna metoda namenjena tudi ocenjevanju celovitosti in zmogljivosti moških in ženskih reproduktivnih sistemov ter rasti in razvoja generacije F2. Za nadaljnje informacije o strupenosti za razvoj in funkcionalnih pomanjkljivostih se lahko bodisi vključi dodatne študijske segmente v ta protokol s primerno uporabo metod za strupenost za razvoj in/ali razvojno nevrotoksičnost bodisi se te ciljne učinke preuči v posebnih študijah z uporabo ustreznih preskusnih metod.

1.2 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samci generacije P morajo dobivati odmerek med rastjo in še najmanj en celotni spermatogenetski cikel (približno 56 dni pri miši in 70 dni pri podgani), da bi se pokazali kakršni koli škodljivi učinki na spermatogenezo. Učinki na seme se določijo s številnimi parametri semena (npr. morfologijo in gibljivostjo semena) in s pripravo tkiva in podrobno histopatologijo. Če so na voljo podatki o spermatogenezi iz prejšnjih študij s ponavljajočimi odmerki z dovolj dolgim trajanjem, npr. iz 90-dnevne študije, ni nujno, da se v vrednotenje vključijo samci generacije P. Vsekakor pa je priporočljivo, da se shranijo vzorci ali digitalni posnetki semena generacije P, da se omogoči poznejše vrednotenje. Samice generacije P morajo dobivati odmerek med rastjo in še nekaj celotnih ciklov estrusa, da bi odkrili kakršne koli škodljive učinke preskusne snovi na normalen cikel estrusa. Preskusna snov se daje staršem (P) med njihovim parjenjem, med posledično brej ostjo in med odstavljanjem njihovih potomcev F1. Med odstavljanjem se nadaljuje z dajanjem snovi potomcem F1 med njihovo rastjo do odraslosti, parjenja in ustvarjenja generacije F2, dokler se ne odstavi generacija F2.

Na vseh živalih se izvajajo klinična opazovanja in patološki pregledi glede znakov strupenosti s posebnim poudarkom na učinke na celovitost in zmogljivost moških in ženskih reproduktivnih sistemov in na rast in razvoj potomcev.

▼B

1.3 OPIS PRESKUSNE METODE

1.3.1 **Izbira živalskih vrst**

Priporočena vrsta za preskušanje je podgana. Če se uporabijo druge vrste, je treba to utemeljiti in potrebne so ustrezne spremembe. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Na začetku študije morajo biti razlike v masi posameznih živali čim manjše in ne smejo presegati ± 20 % povprečne mase za vsak spol.

1.3.2 **Nastanitvene in prehranjevalne razmere**

Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi naj bo 22 °C (± 3 °C). Čeprav naj bi bila relativna vlažnost najmanj 30 % in je zaželeno, da ne presega 70 %, razen v času čiščenja prostora, je cilj 50-60 %. Osvetlitev naj bo umetna, zaporedje 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo. Na izbiro prehrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne snovi, kadar se daje po tej metodi.

Živali se lahko namestijo posamično ali dajo v kletke v manjših skupinah istega spola. Parjenje naj se izvaja v kletkah, ki so primerne za ta namen. Po dokazu o kopulaciji se sparjene samice posamično naselijo v kletke za kotitev ali kletke za matere. Sparjene podgane so lahko tudi v manjših skupinah in se ločijo en dan ali dva pred kotitvijo. Ko je kotitev blizu, se sparjenim živalim zagotovi ustrezen in določen material za izdelavo gnezda.

1.3.3 **Priprava živali**

Uporabiti je treba zdrave mlade živali, ki so se najmanj pet dni prilagajale na laboratorijske razmere in predhodno niso bile uporabljene za poskuse. Poznati je treba vrsto, sev, vir, spol, maso in/ali starost poskusnih živali. Znana morajo biti sorodstvena razmerja med živalmi, tako da se je mogoče izogniti parjenju med sorojenci. Živali se naključno dodelijo v kontrolno in tretirano skupino (priporočljiva je plastitev po telesni masi). Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi pozicije kletk čim manjši. Vsaki živali se dodeli enotna identifikacijska številka. Pri generaciji P je to treba narediti, preden se začne odmerjanje. Pri generaciji F1 se to naredi ob odstavljanju živali, izbranih za parjenje. Za vse izbrane živali F1 je treba voditi evidenco z navedbo o poreklu zaroda. Poleg tega je priporočljiva posamična identifikacija mladičev čim prej po rojstvu, če se načrtuje posamično tehtanje mladičev ali kakršne koli funkcionalne preskuse.

Starši (P) so na začetku odmerjanja stari približno 5 do 9 tednov. Živali v vseh preskusnih skupinah naj bodo čim enotnejše po masi in starosti.

▼B

1.4 POSTOPEK

1.4.1 **Število in spol živali**

Vsaka preskusna in kontrolna skupina mora vsebovati zadostno število živali, da nastane po možnosti najmanj 20 brejih samic, ki kotijo ali so blizu kotitve. Pri snoveh, ki povzročajo nezaželene učinke, povezane s tretiranjem (npr. sterilnost, čezmerna toksičnost pri velikem odmerku), to ni mogoče. Cilj je dobiti dovolj brejih samic, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala snovi za vplivanje na plodnost, brej ost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F1 od spočetja do zrelosti in razvoj njihovih potomcev (F2) do odstavitve. Če zaželeno število brejih živali (to je 20) ni doseženo, študija s tem torej ni nujno ovržena in je potrebno vrednotenje vsakega primera posebej.

1.4.2 **Priprava odmerkov**

Priporoča se, da se preskusna snov daje oralno (s hrano, pitno vodo ali gavažo), razen če se šteje drug način dajanja (npr. dermalno ali z vdihavanjem) za primernejšega.

Po potrebi se preskusna snov raztopi ali suspendira v primernem nosilcu. Priporočljivo je, da se, kadar koli je mogoče, najprej razmisli o uporabi vodne raztopine/suspenzije, potem o raztopini/emulziji v olju (npr. koruzno olje), šele nato o možni raztopini v drugih nosilcih. V primeru nosilcev, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega nosilca. Določiti je treba stabilnost preskusne snovi v nosilcu.

1.4.3 **Odmerjanje**

Uporabijo se najmanj tri velikosti odmerkov in hkratna kontrola. Razen kadar zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ali bioloških učinkov preskusne snovi to ni mogoče, je treba najvišjo velikost odmerka izbrati z namenom, da se povzroči toksičnost, vendar ne smrt ali hudo trpljenje. V primeru nepričakovane smrtnosti, so študije s stopnjo smrtnosti, manjšo od približno 10 odstotkov pri starših (P), navadno še vedno sprejemljive. Padajoče zaporedje velikosti odmerkov je treba izbrati tako, da se pokažejo vse reakcije, ki so odvisne od odmerka, in vrednost brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL). Za padajoče zaporedje velikosti odmerkov so pogosto optimalni dvakratni do štirikratni intervali, pogosto pa je bolje dodati še dodatno četrto preskusno skupino, kakor uporabiti zelo velike intervale med odmerki (npr. več kot faktor 10). Pri študijah odmerjanja s hrano interval odmerka ne bi smel biti večji od trikratnega. Vrednosti odmerkov je treba izbirati ob upoštevanju vseh obstoječih podatkov o strupenosti, zlasti rezultate iz študij s ponavljajočimi odmerki. Upoštevajo se tudi vse razpoložljive informacije o presnovi in kinetiki preskusne zmesi ali sorodnih materialov. Te informacije poleg tega pomagajo tudi pri dokazovanju ustreznosti režima odmerjanja.

▼B

Kontrolna skupina je netretirana skupina ali kontrolna skupina, tretirana samo z nosilcem, če je ta uporabljen pri dajanju preskusne snovi. Razen pri tretiranju s preskusno snovjo, morajo biti živali v kontrolni skupini obravnavane enako kakor živali v preskusni skupini. Če je uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti količino nosilca, enako največji uporabljeni količini. Če se preskusna snov daje s hrano in povzroča zmanjšan vnos ali izkoristek hrane, potem je morda potrebna uporaba po parih hranjene kontrolne skupine. Namesto hkratne po parih hranjene kontrolne skupine se lahko uporabijo podatki iz nadzorovanih študij, namenjenih ovrednotenju učinkov zmanjšane porabe hrane na reproduktivne parametre.

Upoštevati je treba naslednje lastnosti nosilca in drugih aditivov: učinke na absorpcijo, distribucijo, presnovo ali retencijo preskusne snovi; učinke na kemijske lastnosti preskusne snovi, ki lahko spremenijo njene toksične lastnosti; ter učinke na porabo hrane ali vode ali status prehranjenosti živali.

1.4.4 **Mejni preskus**

Če oralna študija pri eni velikosti odmerka najmanj 1 000 mg/kg telesne mase/dan ali enakovreden odstotek hrane ali pitne vode pri dajanju hrane ali pitne vode, pri kateri se uporabijo postopki, opisani za to študijo, ne povzroči opaznih toksičnih učinkov ne pri starših ne pri njihovih potomcih in se glede na podatke o strukturno in/ali presnovno sorodnih zmeseh ne pričakuje učinka, potem se šteje, da ni potrebna popolna študija z uporabo več velikosti odmerkov. Mejni preskus se lahko uporabi za vse primere, razen kadar človekova izpostavljenost kaže na potrebo po uporabi večje velikosti odmerka. Pri drugih vrstah dajanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne snovi, na primer topnost, pogosto določajo in omejujejo največjo dosegljivo raven izpostavljenosti.

1.4.5 **Dajanje odmerkov**

Živali naj dobivajo preskusno snov 7 dni na teden. Zaželena je oralna pot dajanja (prehrana, pitna voda ali gavaža). Če se uporabi drug način dajanja, je treba to utemeljiti in lahko so potrebne ustrezne spremembe. V ustreznem preskusnem obdobju vse živali dobivajo odmerke po enaki metodi. Kadar se preskusna snov daje z gavažo, je treba to storiti z uporabo želodčne sonde. Količina tekočine, ki se da naenkrat, ne sme presegati 1 ml/100 g telesne mase (pri koruznem olju največ 0,4 ml/100 g telesne mase), razen v primeru vodnih raztopin, kjer se sme uporabiti 2 ml/100 g telesne mase. Razen pri dražečih ali jedkih snoveh, ki pri višjih koncentracijah navadno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, zato da bi zagotovili konstantno količino pri vseh odmerkih. Pri študijah z gavažo mladiči navadno dobivajo preskusno snov samo posredno skozi mleko, dokler se zanje po odstavitvi ne začne neposredno dajanje odmerkov. Pri študijah s prehrano ali pitno vodo dobijo mladiči dodatno preskusno snov neposredno, ko začnejo v zadnjem tednu laktacijskega obdobja sami jesti.

▼B

Pri snoveh, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne snovi ne vplivajo na običajno raven vnosa hrane ali porabe vode. Kadar se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali; treba je navesti uporabljeni način. Če dajemo snov z gavažo, je treba odmerke dati vsak dan približno ob istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagoditi, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali. Pri prilagajanju odmerka gavaže, ki temelji na masi, je treba upoštevati informacije o porazdelitvi posteljice.

1.4.6 **Načrti za poskuse**

Dnevno dajanje odmerkov starševskim (P) samcem in samicam se začne, ko so stari 5 do 9 tednov. Dnevno dajanje odmerkov samcem in samicam F1 se začne ob odstavitvi; treba pa je upoštevati, da se lahko v primeru dajanja preskusne snovi s hrano ali pitno vodo začne neposredna izpostavljenost mladičev F1 preskusni snovi že v laktacijskem obdobju. Pri obeh spolih (P in F1) se odmerjanje nadaljuje najmanj 10 tednov pred obdobjem parjenja. Odmerjanje se nadaljuje pri obeh spolih še 2 tedna v obdobju parjenja. Samce je treba humano usmrtiti in preučiti, ko niso več potrebni za ocenjevanje reproduktivnih učinkov. Pri starševskih (P) samicah se mora odmerjanje nadaljevati skozi ves čas brej osti in do odstavljanja potomcev F1. Upoštevati je treba spremembe načrta odmerjanja, ki temeljijo na razpoložljivih informacijah o preskusni snovi, vključno z obstoječimi podatki o toksičnosti, nastajanju presnove ali bioakumulaciji. Odmerek za vsako žival navadno temelji na zadnji posamični določitvi telesne mase. Vendar je potrebna previdnost pri prilagajanju odmerka v zadnjem trimestni brej osti.

Tretiranje samcev in samic P in F1 se nadaljuje do konca. Vse odrasle samce in samice P in F1 je treba humano usmrtiti, ko niso več potrebni za ocenjevanje reproduktivnih učinkov. Potomci F1, ki niso izbrani za parjenje, in vsi potomci F2 se humano usmrtijo po odstavitvi.

1.4.7 **Postopek parjenja**

1.4.7.1 Parjenje staršev (P)

Pri vsakem parjenju se vsaka samica da skupaj z enim samcem z enako velikostjo odmerka (parjenje 1: 1), dokler ne pride do kopulacije ali dokler ne mineta 2 tedna. Samice se vsak dan pregledajo glede navzočnosti semena ali vaginalnega čepa. Dan brej osti 0 je opredeljen kot dan, ko je najden vaginalni čep ali seme. V primeru, da parjenje ni uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine. Sparjeni pari morajo biti jasno navedeni v podatkih. Parjenju sorojencev se je treba izogibati.

▼B

1.4.7.2 Parjenje F1

Pri parjenju potomcev F1, je treba iz vsakega zaroda po odstavitvi izbrati najmanj enega samca in eno samico za parjenje z drugimi mladiči z enako velikostjo odmerka, vendar iz drugega zaroda, za ustvarjenje generacije F2. Izbira mladičev iz vsakega zaroda mora biti naključna, brez značilnih opaznih razlik v telesni masi ali videzu med vrstniki iz zaroda. V primeru, da so opažene te razlike, je treba izbrati najboljše predstavnike iz vsakega zaroda. Praktično je to najbolje storiti glede na telesno maso, lahko pa je primernejše na podlagi videza. Potomci F1 se ne bi smeli pariti, dokler ne dosežejo polne spolne zrelosti.

Pari brez potomcev se morajo ovrednotiti, da se določi pravi vzrok neplodnosti. To lahko vključuje postopke, kot so dodatne možnosti za parjenje z drugimi dokazanimi očeti ali materami, mikroskopski pregled reproduktivnih organov in pregled ciklov estrusa ali spermatogeneze.

1.4.7.3 Drugo parjenje

V nekaterih primerih, na primer pri spremembah velikosti zaroda, povezanih s tretiranjem, ali pri opaženem dvoumnem učinku pri prvem parjenju, je priporočljivo, da se odrasli P ali F1 ponovno parijo, da bi ustvarili drugi zarod. Priporočeno je, da se ponovno parijo samice ali samci, ki niso ustvarili zaroda z dokazanimi plemenskimi živalmi nasprotnega spola. Če se zdi, da je pri kateri koli generaciji potrebno ustvariti drugi zarod, je treba živali ponovno pariti približno en teden po odstavitvi zadnjega zaroda.

1.4.7.4 Velikost zaroda

Živalim se dovoli, da normalno skotijo in redijo svoje potomce do odstavitve. Standardizacija velikosti zaroda ni obvezna. Kadar se standardizacija opravi, se metoda podrobno opiše.

1.5 OPAZOVANJA

1.5.1 **Klinična opazovanja**

Splošno klinično opazovanje je treba opraviti vsak dan in v primeru dajanja odmerkov z gavažo je treba upoštevati vrhunec pričakovanih učinkov po odmerjanju. Zabeležiti je treba vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake toksičnosti. Dodatni, podrobnejši pregled vsake živali se izvede najmanj enkrat tedensko in se lahko primerno opravi takrat, ko se žival tehta. Dvakrat dnevno, ob koncu tedna pa enkrat dnevno, je treba vse živali opazovati glede obolevnosti in smrtnosti.

▼B

1.5.2 **Telesna masa in poraba hrane/vode pri starših**

Starši (P in F1) se stehtajo prvi dan dajanja odmerkov in potem najmanj enkrat tedensko. Starševske samice (P in F1) se med brejostjo stehtajo najmanj na 0., 7., 14. in 20. ali 21. dan ter med laktacijo na iste dneve, kot je tehtanje zaroda, in na dan, ko so živali usmrčene. O teh opazovanjih je treba poročati posamično za vsako odraslo žival. Med obdobjem pred parjenjem in med brejostjo se poraba hrane meri najmanj tedensko. Poraba vode se meri najmanj tedensko, če se preskusna snov daje z vodo.

1.5.3 **Cikel estrusa**

Dolžina in normalnost cikla estrusa se pri samicah P in F1 ovrednotita z vaginalnim brisom pred parjenjem in po izbiri med parjenjem, dokler ni najden dokaz o parjenju. Med jemanjem vaginalnih/vratnih celic je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in pozneje do nastanka psevdogravidnosti (1).

1.5.4 **Parametri semena**

Pri vseh samcih P in F1 se na koncu zabeleži teža moda in obmodka in po en organ od vsakega shrani za histopatološki pregled (glej oddelek 1.5.7, 1.5.8.1). Za podskupino najmanj desetih samcev iz vsake skupine samcev P in F1 je treba preostala moda in obmodke uporabiti za štetje semenčic, odpornih na homogenizacijo, ali zalog semena v repu obmodka. Pri tej isti podskupini samcev je treba zbrati seme iz repov obmodkov ali semenovodov za ovrednotenje gibljivosti in morfologije semena. Če se opazujejo učinki, povezani s tretiranjem, ali kadar je v drugih študijah dokaz za možne učinke na spermatogenezo, se ovrednotenje semena izvede pri vseh samcih v vsaki skupini odmerka; drugače se lahko štetje omeji na kontrolne samce in samce P in F1 z velikim odmerkom.

Prešteti je treba tudi celotno število semenčic iz moda, ki so odporne na homogenizacijo, in seme iz repa obmodka (2) (3). Na zaloge semena v repu se lahko sklepa po koncentraciji in količini semena v suspenziji, ki se uporabi za dokončanje kakovostnih vrednotenj, in števila semena, dobljenega z naknadnim mletjem in/ali homogeniziranjem preostalega tkiva repa obmodka. Štetje je treba izvesti na izbrani podskupini samcev iz vseh skupin odmerkov takoj po usmrtitvi živali, razen če so narejeni video ali digitalni posnetki ali če se primerki zamrznejo in analizirajo pozneje. V teh primerih se lahko najprej analizirajo kontrole in skupina z velikim odmerkom. Če niso vidni nobeni učinki, povezani s tretiranjem (npr. učinki na število semenčic, gibljivost ali morfologijo), drugih skupin odmerkov ni treba analizirati. Kadar se učinki, povezani s tretiranjem, opazijo v skupini z velikim odmerkom, je treba ovrednotiti tudi skupine z manjšim odmerkom.

▼B

Gibljivost semena v obmodku (ali semenovodu) je treba ovrednotiti ali posneti na video takoj po usmrtitvi. Seme je treba ohraniti s čim manjšimi poškodbami in razredčiti za analizo gibljivosti s sprejemljivimi metodami (4). Odstotek progresivno gibljivega semena je treba določiti bodisi subjektivno ali objektivno. Kadar se opravi analiza gibanja s pomočjo računalnika (5) (6) (7) (8) (9) (10), izpeljava progresivne gibljivosti temelji na uporabniško določenih pragovih za povprečno hitrost ali na linearnem indeksu. Če se v času obdukcije vzorci posnamejo na videotrak (11) ali se drugače zabeležijo slike, se lahko pozneje analizirajo le samci P in F1 iz kontrolne skupine in skupine z velikim odmerkom, razen če so opazni učinki, povezani s tretiranjem, v tem primeru je treba ovrednotiti tudi skupine z manjšim odmerkom. Če ni video ali digitalne slike, se morajo ob obdukciji analizirati vsi vzorci iz vseh tretiranih skupin.

Treba je opraviti morfološko ovrednotenje semena iz obmodka (ali semenovoda). Seme (najmanj 200 na vzorec) je treba preučiti kot fiksirane, mokre preparate (12) in ga razvrstiti bodisi v normalno ali nenormalno. Primeri morfoloških anomalij semena vključujejo spojitev, ločene glavice ter glavice in/ali repke nepravilnih oblik. Ovrednotenje je treba izvesti na izbrani podskupini samcev v vseh skupinah odmerkov bodisi takoj po usmrtitvi živali ali pozneje na podlagi video ali digitalnih posnetkov. Tudi brisi se, potem ko so fiksirani, lahko preučujejo pozneje. V teh primerih se lahko najprej analizirajo kontrole in skupina z velikim odmerkom. Če niso vidni nobeni učinki (npr. učinki na morfologijo semena), drugih skupin odmerkov ni treba analizirati. Kadar se učinki, povezani s tretiranjem, opazijo v skupini z velikim odmerkom, je treba ovrednotiti tudi skupine z manjšim odmerkom.

Če so bili zgornji parametri za ovrednotenje semena že preučeni v študiji sistemske toksičnosti, ki je trajala vsaj 90 dni, jih ni treba ponoviti v dvogeneracijski študiji. Vsekakor pa je priporočljivo, da se shranijo vzorci ali digitalni posnetki semena generacije P, da se omogoči poznejše vrednotenje, če bi bilo potrebno.

1.5.5 **Potomci**

Vsak zarod je treba preučiti čim prej po skotitvi (laktacijski dan 0) in ugotoviti število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih, in navzočnost večjih nepravilnosti. Mladiče, ki so mrtvi na dan 0, je najbolje, če se ne macerirajo, preučiti glede možnih napak in vzroka smrti in konzervirati. Žive mladiče je treba prešteti in posamično stehtati ob skotitvi (laktacijski dan 0) ali na dan 1 in pozneje na dneve rednega tehtanja, npr. na 4., 7., 14. in 21. dan laktacije. Treba je evidentirati telesne ali vedenjske anomalije, ki se opazijo pri materah ali njihovih potomcih.

▼B

Telesni razvoj potomcev je treba zabeležiti v glavnem po prirastu telesne mase. Drugi telesni parametri (npr. očesne in ušesne odprtine, izbijanje zob, rast las) lahko dajo dodatne informacije, a ti podatki se raje ovrednotijo v kontekstu podatkov o spolni zrelosti (npr. starost in telesna masa ob vaginalni odprtini ali ločitvi prepucija na glavici penisa) (13). Funkcionalne preiskave (npr. motorične dejavnosti, senzorne funkcije, refleksna ontogenija) potomcev F1 pred in/ali po odstavitvi, zlasti tiste, ki se nanašajo na spolno zrelost, so priporočljive, če take preiskave niso vključene v posebne študije. Starost vaginalne odprtine in ločitve prepucija je treba določiti pri odstavljenih mladičih F1, izbranih za parjenje. Zadnjično-genitalno razdaljo pri mladičih F2 je treba izmeriti na poporodni dan 0, če jo sprožijo spremembe v razmerju spolov pri F1 ali časovna uskladitev spolne zrelosti.

Funkcionalna opazovanja se lahko opustijo pri skupinah, ki sicer jasno kažejo znake škodljivih učinkov (npr. znatno zmanjšanje pridobivanja telesne mase itd.). Če se opravljajo funkcionalne preiskave, naj se ne delajo na mladičih, ki so izbrani za parjenje.

1.5.6 **Obdukcija**

Na koncu študije ali ob smrti med študijo se makroskopsko pregledajo vsi starši (P in F1), vsi mladiči z zunanjimi anomalijami ali kliničnimi znaki, pa tudi po en naključno izbran mladič vsakega spola in zaroda iz obeh generacij F1 in F2 glede kakršnih koli strukturnih anomalij ali patoloških sprememb. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Mladiče, ki so humano usmrčeni v razmerah poginjanja, in mrtve mladiče je treba, če se ne macerirajo, preučiti glede možnih napak in/ali vzroka smrti in konzervirati.

Maternice vseh samic, ki so prvič kotile, se pregledajo na način, ki ne škoduje histopatološkemu ovrednotenju, glede navzočnosti in števila vgnezditev.

1.5.7 **Masa organov**

Na koncu se določi telesna masa in masa naslednjih organov vseh staršev P in F1 (parni organi se stehtajo posamično):

— maternice, jajčnikov,

— mod, obmodkov (v celoti in repa),

— prostate,

— semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami in njihovimi tekočinami ter prostato (kot ena enota),

— možganov, jeter, ledvic, vranice, hipofize, ščitnice in nadledvičnih žlez ter znanih ciljnih organov.

Končno telesno maso je treba določiti za mladiče F1 in F2, ki so izbrani za obdukcijo. Stehtajo se naslednji organi po enega naključno izbranega mladiča vsakega spola in zaroda (glej oddelek 1.5.6): možgani, vranica in priželjc.

▼B

Rezultate obdukcije in tehtanja organov je treba oceniti v smislu ugotovitev iz drugih študij s ponavljajočimi odmerki, kadar je to izvedljivo.

1.5.8 **Histopatologija**

1.5.8.1 Starši

Naslednji organi in tkiva staršev (P in F1) ali njihovi reprezentativni vzorci se fiksirajo in shranijo v primernem mediju za histopatološki pregled.

— nožnica, maternica z vratom in jajčniki (shranjeni v ustreznem fiksativu),

— eno modo (konzervirano v Bouinovem ali primerljivem fiksativu), en obmodek, semenski mešički, prostata in koagulacijska žleza,

— predhodno določen(i) ciljni organ(i) vseh staršev P in F1, izbranih za parjenje.

Celotna histopatologija zgoraj naštetih konzerviranih organov in tkiv se izvede za vse živali z velikim odmerkom in za vse kontrolne živali P in F1, izbrane za parjenje. Pregled jajčnikov živali P ni obvezen. Organi, pri katerih je opaziti spremembe, povezane s tretiranjen, je treba pregledati tudi v skupinah z majhnim in srednjim odmerkom, da se lažje pojasni vrednost brez opaznih škodljivih učinkov. Poleg tega se histopatološko ovrednotijo reproduktivni organi živali z majhnim in srednjim odmerkom, za katere se domneva zmanjšana plodnost, npr. pri tistih, ki se niso mogli spariti, spočeti, zaploditi ali skotiti zdravih potomcev, ali pri katerih so prizadeti cikličnost estrusa ali število, gibljivost ali morfologija semena. Pregledajo se vse makroskopske lezije, na primer atrofija ali tumorji.

Treba je izvesti podroben histopatološki pregled mod (npr. z uporabo Bouinovega fiksativa, vstavljanja v parafin in prečnih prerezov debeline 4–5 um), da bi ugotovili učinke, povezane s tretiranjem, kot so zastale semenčice, manjkajoče plasti ali vrste kličnih celic, celice velikanke z več jedri ali uhajanje spermatogenih celic v svetlino (14). Pregled nepoškodovanega obmodka mora vključevati glavo, telo in rep, ki se lahko opravi z ocenjevanjem podolžnega prereza. Obmodek je treba oceniti glede prenikanja belih krvničk, spremembe prevladujoče vrste celic, vrst okvarjenih celic in fagocitoze semena. Za preučitev moških reproduktivnih organov se lahko uporabita PAS in barvanje s hematoksilinom.

Postlaktacijski jajčnik bi moral vsebovati začetne in rastoče folikle, pa tudi veliko rumenih telesc iz laktacije. Histopatološki pregled bi moral odkriti kakovostno izgubljanje populacije začetnih foliklov. Količinsko vrednotenje začetnih foliklov je treba izvesti za samice F1; število živali, izbira prereza jajčnika in velikost vzorca prereza morajo biti statistično ustrezni za uporabljeni postopek ocenjevanja. Pregled mora vključevati štetje števila začetnih foliklov, ki se lahko kombinirajo z majhnimi rastočimi folikli, za primerjavo tretiranih in kontrolnih jajčnikov (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2 Odstavljeni mladiči

Pretežno nenormalno tkivo in ciljni organi vseh mladičev z zunanjimi anomalijami ali kliničnimi znaki, pa tudi po en naključno izbran mladič vsakega spola in zaroda iz obeh generacij F1 in F2, ki niso bili izbrani za parjenje, se fiksirajo in shranijo v primernem mediju za histopatološki pregled. Izvede se celotni histopatološki opis značilnosti konzerviranih tkiv s posebnim poudarkom na organih reproduktivnega sistema.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki se sporočajo posamično in se povzamejo v obliki tabele, ki prikazuje za vsako preskusno skupino in vsako generacijo število živali na začetku preskusa, število živali, najdenih mrtvih ali usmrčenih iz humanih razlogov med preskusom, čas katere koli smrti ali humane usmrtitve, število plodnih živali, število brejih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanja in resnosti katerih koli toksičnih učinkov, vrsto opažanj o starših in potomcih, vrstah histopatoloških sprememb in vseh ustreznih podatkov o zarodu.

Številčni rezultati se morajo oceniti z ustrezno splošno sprejeto statistično metodo; statistične metode je treba določiti pri načrtovanju študije in jih utemeljiti. Za analiziranje podatkov so lahko koristni statistični modeli odziva v odvisnosti od odmerka. Poročilo mora vključevati dovolj informacij o metodi analize in uporabljenem računalniškem programu, tako da lahko neodvisni ocenjevalec/statistik ponovno ovrednoti in obnovi analizo.

2.2 VREDNOTENJE REZULTATOV

Ugotovitve te študije dvogeneracijske reproduktivne strupenosti je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, vključno z obdukcijo in mikroskopskimi ugotovitvami. Vrednotenje vključuje razmerje ali njegovo odsotnost med odmerkom preskusne snovi in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z makroskopskimi lezijami, ugotovljenimi ciljnimi organi, prizadeto plodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivost reproduktivnosti in zaroda, spremembe telesne mase, učinke na smrtnost in druge strupene učinke. Pri vrednotenju rezultatov preskusa je treba upoštevati fizikalno-kemijske lastnosti preskusne snovi in toksikokinetične podatke, če so na voljo.

Pravilno izveden preskus reproduktivne strupenosti mora dati zadovoljivo oceno vrednosti brez učinka in razumevanje škodljivih učinkov na reprodukcijo, kotitev, laktacijo, poporodni razvoj vključno z rastjo in spolnim razvojem.

▼B

2.3 RAZLAGA REZULTATOV

Študija dvogeneracijske reproduktivne strupenosti zagotovi informacije o učinkih ponovne izpostavljenosti snovi v vseh fazah reproduktivnega cikla. Študija zagotovi zlasti informacije o reproduktivnih parametrih in o razvoju, rasti, dozorevanju in preživetju potomcev. Rezultate študije je treba razlagati skupaj z ugotovitvami sub kronične študije, študije predroj stvenega razvoja, toksikokinetične ter drugih razpoložljivih študij. Rezultati te študije se lahko uporabijo pri ocenjevanju potrebe po nadaljnjem preskušanju kemikalije. Ekstrapolacija rezultatov študije na človeka je veljavna le do omejene stopnje. Rezultati so najuporabnejši za zagotovitev informacij o vrednostih brez učinka in dovoljeni človekovi izpostavljenosti (20) (21) (22) (23).

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijske podatke,

— čistost.

Nosilec (po potrebi):

— utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljeno vrsto/sev,

— število, starost in spol živali,

— izvor, nastanitvene razmere, hrano, material za izdelavo gnezda itd.,

— maso posameznih živali na začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— utemeljitev izbire velikosti odmerka,

— podatke o sestavi preskusne snovi/pripravi hrane, doseženi koncentraciji,

— stabilnost in homogenost pripravka,

— podatke o dajanju preskusne snovi,

— preračunavanje koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne mase/dan), če je primerno,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

▼B

Rezultati:

— porabo hrane in porabo vode, če je na voljo, izkoristek hrane (prirast telesne mase na gram porabljene hrane) in porabo preskusnega materiala za živali P in F1, razen za obdobje sobivanja in najmanj za zadnjo tretjino laktacije,

— podatke o absorpciji (če so na voljo),

— podatke o telesni masi za živali P in F1, ki so izbrane za parjenje,

— podatke o masi zaroda in mladičev,

— telesno maso ob usmrtitvi in podatke o absolutni in relativni telesni masi organov za starše,

— vrsto, resnost in trajanje kliničnih opažanj (ali so reverzibilna ali ne),

— čas smrti med študijo in, če živali preživijo, do konca,

— podatke o toksičnem učinkovanju glede na spol in odmerek, vključno z znaki parjenja, plodnostjo, brej ostjo, skotitvijo, sposobnostjo za preživetje in laktacijo; poročilo mora navajati številke, uporabljene pri izračunu teh kazalnikov,

— toksične ali druge učinke na reprodukcijo, potomce, poporodno rast itd.,

— ugotovitve obdukcije,

— natančen opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— število samic P in F1 z normalnim ciklom in dolžino cikla,

— skupno število semena v repu obmodka, odstotek progresivno gibljivega semena, odstotek morfološko normalnega semena in odstotek semena z vsako ugotovljeno anomalijo,

— čas za parjenje, vključno s številom dni pred parjenjem,

— dolžino brejosti,

— število vgnezditev, rumenih telesc, velikost zaroda,

— število živorojenih in izgub po vgnezditvi,

— število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami, če je treba poročati o številu spačkov,

— podatke o telesnih znakih pri mladičih in drugih poporodnih razvojnih podatkih; ovrednotene telesne znake je treba utemeljiti,

— podatke o opazovanju funkcij pri mladičih in odraslih, kot je primerno,

— statistično obdelavo rezultatov, po potrebi.

▼B

Razprava o rezultatih.

Zaključki, tudi vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov pri materah in potomcih.

4. **LITERATURA**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12: 92–108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 103–107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5: 39–44

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3): 237–244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6: 267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13: 409–421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5: 449–458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8: 330–337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6: 491–505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17: 298–303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421–426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5: 379–383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOKSIKOKINETIKA**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza OECD TG 417 (2010). Študije, s katerimi se preučuje toksikokinetika (TK) preskusne kemikalije, se izvajajo za pridobitev zadostnih informacij o njeni absorpciji, porazdelitvi, biotransformaciji (tj. presnovi) in izločanju, za pomoč pri povezovanju koncentracije ali odmerka z opaženo strupenostjo ter za razumevanje mehanizma strupenosti te kemikalije. TK lahko pomaga razumeti toksikološke študije z dokazovanjem, da so preskusne živali sistemsko izpostavljene preskusni kemikaliji, in razkrivanjem, kateri deli kemikalije krožijo (izhodiščna kemikalija/metaboliti). Osnovni toksikokinetični parametri, določeni v teh študijah, zagotavljajo tudi informacije o potencialu za kopičenje preskusne kemikalije v tkivih in/ali organih ter potencialu za indukcijo biotransformacije, ki je posledica izpostavljenosti preskusni kemikaliji.

2. Toksikokinetični podatki lahko pomagajo oceniti, ali so podatki o strupenosti za živali ustrezni in uporabni za ekstrapolacijo v oceno nevarnosti in/ali tveganja za ljudi. Poleg tega se lahko s toksikokinetičnimi študijami pridobijo koristne informacije za določanje velikosti odmerkov pri toksikoloških študijah (linearna/nelinearna kinetika) ter za ugotavljanje učinkov načina dajanja, biološke dostopnosti in vidikov, povezanih z zasnovo študije. Nekatere vrste toksikokinetičnih podatkov je mogoče uporabiti pri zasnovi toksikokinetičnih modelov, temelječih na fiziologiji (PBTK).

3. Podatki o metabolitih/toksikokinetični podatki imajo pomembne uporabe, kot je nakazovanje morebitnih strupenosti in načinov delovanja ter njihove povezanosti z velikostjo odmerka in načinom izpostavljenosti. Poleg tega se lahko s podatki o presnovi pridobijo informacije, ki so uporabne pri ocenjevanju toksikološkega pomena izpostavljenosti eksogeno ustvarjenim metabolitom preskusne kemikalije.

4. Ustrezni toksikokinetični podatki lahko pomagajo dodatno podkrepiti sprejemljivost in uporabnost kvantitativnih razmerij med strukturo in aktivnostjo ter pristopov navzkrižnega branja ali združevanja v skupine pri ocenjevanju varnosti kemikalij. Poleg tega se lahko kinetični podatki uporabljajo tudi za ocenjevanje toksikološkega pomena drugih študij (npr. *in vivo*/*in vitro*).

5. Če niso navedeni drugi načini dajanja (glej zlasti odstavke 74–78), se ta preskusna metoda uporablja za oralno dajanje preskusne kemikalije.

ZAČETNI PREUDARKI

6. Zakonodajni sistemi imajo za različne razrede kemikalij (npr. pesticide, biocide, industrijske kemikalije) različne zahteve in potrebe glede merjenja končnih točk in parametrov, povezanih s toksikokinetiko. V nasprotju z večino preskusnih metod je v tej preskusni metodi opisano toksikokinetično preskušanje, ki vključuje več meritev in končnih točk. V prihodnosti bo morda pripravljenih več novih preskusnih metod in/ali dokumentov s smernicami, v katerih bo podrobneje opisana vsaka končna točka posebej. V primeru te preskusne metode je odločitev o tem, kateri preskusi ali ocene se izvedejo, odvisna od zahtev in/ali potreb posameznega zakonodajnega sistema.

▼M4

7. Za ocenjevanje toksikokinetičnega vedenja preskusne kemikalije za zakonodajne namene se lahko izvedejo številne študije. Vendar glede na posebne zakonodajne potrebe ali okoliščine za ocenjevanje preskusne kemikalije vse morda niso potrebne. Pri zasnovi toksikokinetičnih študij sta potrebna prožnost in upoštevanje lastnosti preiskovane preskusne kemikalije. Včasih je morda treba preiskati samo določen sklop vprašanj, da se odpravijo pomisleki glede nevarnosti in tveganj, povezani s preskusno kemikalijo. V nekaterih okoliščinah se lahko toksikokinetični podatki zbirajo v okviru ocenjevanja v drugih toksikoloških študijah. Spet v drugih primerih so lahko – odvisno od zakonodajnih potreb in/ali če se pri ocenjevanju preskusne kemikalije pojavijo nova vprašanja – potrebne dodatne in/ali obsežnejše toksikokinetične študije.

8. Da se poveča kakovost študije in v izogib nepotrebni uporabi živali mora preskuševalni laboratorij pred izvedbo študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji ter zadevnih metabolitih in analogih. To lahko vključuje podatke iz drugih ustreznih preskusnih metod (študij *in vivo*, študij *in vitro* in/ali ocen *in silico*). Za načrtovanje študije in razlago rezultatov so lahko koristne fizikalno-kemijske lastnosti, kot so porazdelitveni koeficient oktanol/voda (izražen kot log P_{OW}), pKa, topnost v vodi, parni tlak in molekulska masa kemikalije. Te lastnosti se lahko ugotovijo z ustreznimi metodami, opisanimi v zadevnih preskusnih metodah.

OMEJITVE

9. Ta preskusna metoda ni zasnovana za obravnavanje posebnih okoliščin, kot so breje ali doječe živali in zarod, ali ocenjevanje morebitnih ostankov v izpostavljenih živalih, ki so namenjene proizvodnji hrane. Vendar pa lahko podatki, pridobljeni s študijo B.36, zagotovijo splošne osnovne informacije, ki se uporabijo za usmerjanje zasnove posebnih študij za take preiskave. Ta preskusna metoda ni namenjena preskušanju nanomaterialov. Kot je navedeno v poročilu o predhodnem pregledu smernic za preskušanje OECD, namenjenemu oceni njihove uporabnosti za nanomateriale, se TG 417 (ki ustreza tej preskusni metodi B.36) za nanomateriale ne sme uporabljati (1).

OPREDELITEV POJMOV

10. Pojmi, ki se uporabljajo v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku.

PREUDARKI V ZVEZI Z DOBROBITJO ŽIVALI

11. Napotki o humanem ravnanju z živalmi so na voljo v Dokumentu s smernicami OECD (GD) 19 (2). Priporoča se, naj se GD 19 uporablja za vse študije *in vivo* ter *in vitro*, opisane v tej preskusni metodi.

OPIS METOD

Pilotne študije

12. Uporaba pilotnih študij se priporoča in spodbuja za izbiro preskusnih parametrov toksikoloških študij (npr. presnove, masne bilance, analitskih postopkov, odmernega območja, izdihovanja CO_2 itd.). Za opredelitev nekaterih od teh parametrov uporaba izotopsko označenih kemikalij morda ni potrebna.

▼M4

Izbira živali

Vrsta

13. Živalska vrsta (in sev) v toksikokinetičnem preskušanju mora biti po možnosti ista, kot se uporablja v drugih toksikoloških študijah, izvedenih s preiskovano preskusno kemikalijo. Praviloma je treba uporabiti podgano, saj se v toksikoloških študijah obširno uporablja. Uporaba drugih ali dodatnih vrst je lahko upravičena, če je iz pomembnih toksikoloških študij razvidna precejšnja strupenost za te vrste ali če se pokaže, da je strupenost/toksikokinetika pri njih bolj relevantna za ugotavljanje strupenosti/toksikokinetike pri ljudeh. Izbiro živalske vrste in njenega seva je treba utemeljiti.

14. Če ni navedeno drugače, se pri tej preskusni metodi kot preskusna vrsta uporablja podgana. Za uporabo drugih preskusnih vrst morda je treba nekatere elemente metode morda treba prilagoditi.

Starost in sev

15. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali (v času odmerjanja navadno stare 6–12 tednov) (glej tudi odstavka 13 in 14). Uporabo živali, ki niso mladi odrasli osebki, je treba utemeljiti. Na začetku študije morajo biti vse živali podobne starosti. Teža posameznih živali ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže v preskusni skupini. Po možnosti je treba uporabiti isti sev, ki je bil uporabljen pri pripravi toksikološke zbirke podatkov za preskusno kemikalijo.

Število in spol živali

16. Za vsak preskušeni odmerek je treba uporabiti najmanj štiri živali enega spola. Spol uporabljenih živali je treba utemeljiti. O uporabi obeh spolov (štirih samcev in štirih samic) je treba razmisliti, če obstajajo dokazi o pomembnih razlikah v strupenosti glede na spol.

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

17. V splošnem morajo biti živali v preskusnem obdobju nastanjene posamično. Skupinska nastanitev je lahko utemeljena v posebnih okoliščinah. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °C), relativna vlažnost pa 30–70 %. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode.

Preskusna kemikalija

18. Za vse vidike študije v zvezi z masno bilanco in identifikacijo metabolitov je treba uporabljati preskusno kemikalijo, ki je označena z izotopom ^{14}C. Če pa se lahko dokaže, da:

— je mogoče masno bilanco primerno oceniti in metabolite ustrezno identificirati z neoznačeno preskusno kemikalijo,

— sta analitska specifičnost in občutljivost metode ob uporabi neradioaktivne preskusne kemikalije enaki tistima, ki bi se lahko zagotovili z izotopsko označeno preskusno kemikalijo, ali večji od njiju,

▼M4

izotopsko označene preskusne kemikalije ni treba uporabiti. Poleg tega se lahko uporabijo tudi drugi radioaktivni in stabilni izotopi, zlasti če je zadevni element razlog za strupenost ali je udeležen v strupenem delu preskusne kemikalije. Če je mogoče, mora biti radioaktivni označevalec v osrednjem delu molekule, ki je presnovno stabilen (ni izmenljiv, se ne izloči s presnovo kot CO_2 in ne postane del skupin z enim ogljikovim atomom v organizmu). Za spremljanje presnovne poti preskusne kemikalije je lahko potrebno označevanje več mest ali specifičnih regij molekule.

19. Izotopsko označene preskusne kemikalije in tiste, ki niso izotopsko označene, je treba analizirati z ustreznimi metodami za ugotavljanje čistosti in identitete. Radiokemijska čistost radioaktivne preskusne kemikalije mora biti najvišja dosegljiva za dano preskusno kemikalijo (po možnosti mora biti višja od 95 %), razumno pa si je treba tudi prizadevati za identifikacijo nečistot z vsaj 2-odstotnim deležem. Poročati je treba o čistosti ter identiteti in deležu vseh nečistot, ki so bile identificirane. V posameznih zakonodajnih ureditvah so lahko zagotovljeni dodatni napotki v pomoč pri opredeljevanju in določanju preskusnih kemikalij, sestavljenih iz zmesi, ter metode za določanje čistosti.

Izbira odmerkov

Pilotna študija

20. Navadno za pilotno študijo zadošča enkraten oralni odmerek. Ta ne sme biti strupen, mora pa biti dovolj velik za identifikacijo metabolitov v izločkih (in, če je primerno, plazmi) in izpolnitev opredeljenega namena pilotne študije, kot je navedeno v odstavku 12 te preskusne metode.

Glavne študije

21. Za glavne študije sta priporočljiva najmanj dva odmerka, saj lahko informacije, zbrane na podlagi vsaj dveh odmernih skupin, pomagajo pri določitvi odmerkov v drugih študijah strupenosti in pri ocenjevanju odziva v odvisnosti od odmerka v že razpoložljivih preskusih strupenosti.

22. Kadar se data dva odmerka, morata biti oba dovolj velika, da je mogoče identificirati metabolite v izločkih (in če je primerno, plazmi). Pri izbiri odmerkov je treba upoštevati informacije iz razpoložljivih podatkov o strupenosti. Če te niso na voljo (npr. iz študij akutne oralne strupenosti, v katerih se preiskujejo klinični znaki strupenosti, ali iz študij strupenosti s ponavljajočimi se odmerki), se lahko za večji odmerek predvidi vrednost, ki je nižja od ocene LD_{50} (za oralni in dermalni način dajanja) ali LC_{50} (za inhalacijski način dajanja) ali od nižje vrednosti ocene območja akutne strupenosti. Večji odmerek mora biti eden od večkratnikov manjšega odmerka.

23. Če se preiskuje samo ena velikost odmerka, mora biti ta po možnosti dovolj velik, da je mogoče identificirati metabolite v izločkih (in, če je primerno, plazmi), vendar ne sme povzročiti očitne strupenosti. Nevključitev druge velikosti odmerka je treba utemeljiti.

24. Če je treba ugotoviti učinek odmerka na kinetične procese, dva odmerka morda ne bosta zadoščala, vsaj en odmerek pa mora biti dovolj velik, da se ti procesi nasitijo. Če območje pod krivuljo plazemska koncentracija-čas (AUC) med dvema velikostma odmerkov, ki se uporabljata v glavni študiji, ni linearna, je to dober znak, da se nekje med obema velikostma odmerkov pojavlja nasičenost enega ali več kinetičnih procesov.

▼M4

25. Za preskusne kemikalije z nizko strupenostjo je treba uporabiti največji odmerek 1 000 mg/kg telesne teže (pri oralnem in dermalnem dajanju; če je način dajanja inhalacijski, so napotki v poglavju B.2 te priloge, običajno pa ta odmerek ne presega 2 mg/l). V skladu z zakonodajnimi potrebami je lahko zaradi lastnosti, specifične za obravnavano kemikalijo, potreben večji odmerek. Izbiro odmerkov je treba vedno utemeljiti.

26. Podatki o toksikokinetiki in porazdelitvi v tkivih, pridobljeni z enkratnim odmerkom, lahko zadoščajo za določitev potenciala za kopičenje in/ali obstojnost. Vendar je v nekaterih okoliščinah lahko potrebno dajanje s ponavljajočimi se odmerki, (i) da se celoviteje obravnavajo potencial za kopičenje in/ali obstojnost ali spremembe v TK (npr. indukcija in inhibicija encimov) ali (ii) če se to zahteva v veljavni zakonodajni ureditvi. Čeprav v študijah s ponavljajočimi se odmerki običajno zadošča dajanje ponavljajočih se majhnih odmerkov, je v nekaterih okoliščinah lahko potrebno tudi dajanje ponavljajočih se velikih odmerkov (glej tudi odstavek 57).

Dajanje preskusne kemikalije

27. Preskusno kemikalijo je treba raztopiti ali homogeno suspendirati v enakem nosilcu, kot se uporablja v drugih študijah strupenosti z oralno gavažo, izvedenih z zadevno preskusno kemikalijo, če so take informacije o nosilcu na voljo. Izbiro nosilca je treba utemeljiti. Nosilec in velikost odmerkov je treba predvideti v zasnovi študije. Običajna metoda dajanja je z gavažo, vendar je lahko v določenih okoliščinah primernejše dajanje z želatinastimi kapsulami ali v prehranskih mešanicah (v obeh primerih je treba navesti utemeljitev). Potrditi je treba dejanski odmerek, dan vsaki živali.

28. Največja količina tekočine, ki bo dana naenkrat z oralno gavažo, je odvisna od velikosti preskusnih živali, vrste nosilca za odmerke in tega, ali se živalim pred dajanjem preskusne kemikalije hrana odreka ali ne. Hranjenje ali omejevanje hrane pred dajanjem odmerkov je treba utemeljiti. Praviloma je treba količino ohranjati tako majhno, kot je praktično, kar velja tako za vodne kot nevodne nosilce. Velikosti odmerkov pri glodavcih navadno ne smejo presegati 10 ml/kg telesne teže. Količine nosilcev, ki se uporabijo za bolj lipofilne preskusne kemikalije, se lahko začnejo pri 4 ml/kg telesne teže. Za ponavljajoče se odmerjanje, pri katerem je dnevno postenje kontraindicirano, je treba predvideti manjše velikosti odmerkov (npr. 2–4 ml/kg telesne teže). Kadar je mogoče, je treba razmisliti o uporabi količin odmerkov, ki so v skladu s tistimi, ki so bili uporabljeni v drugih študijah z oralno gavažo v zvezi s preskusno kemikalijo.

29. Intravenozno (IV) dajanje preskusne kemikalije in merjenje njene prisotnosti v krvi in/ali izločkih se lahko uporabita za ugotavljanje biološke dostopnosti ali relativne oralne absorpcije. V IV-študiji se z uporabo ustreznega nosilca da enkraten odmerek preskusne kemikalije (ki je navadno enak manjšemu oralnemu odmerku, ne sme pa ga presegati – glej odstavke o izbiri odmerkov). To snov je treba dati v ustrezni količini (npr. 1 ml/kg telesne teže) na izbranem mestu dajanja najmanj štirim živalim primernega spola (uporabita se lahko oba spola, če je to upravičeno – glej odstavek 16). Za IV-dajanje preskusne kemikalije je potreben popolnoma raztopljen ali suspendiran pripravek z odmerkom. Nosilec za IV-dajanje ne sme vplivati na celovitost

▼M4

ali pretok krvi. Če se preskusna kemikalija daje z infuzijo, je treba o hitrosti infuzije poročati in jo uskladiti za vse živali, če se uporablja infuzijska črpalka. Kadar se izvede kanilacija jugularne vene (za dajanje preskusne kemikalije in/ali odvzem krvi) ali se za dajanje uporabi stegenska arterija, je treba uporabiti anestezijo. O vrsti anestezije je treba skrbno razmisliti, saj lahko vpliva na toksikokinetiko. Preden se živalim da preskusna kemikalija z nosilcem, jim je treba omogočiti, da si dovolj opomorejo.

30. Za nekatere preskusne kemikalije se glede na njihove fizikalno-kemijske lastnosti in pričakovano uporabo ali izpostavljenost ljudi lahko uporabijo drugi načini dajanja, npr. dermalni in inhalacijski (glej odstavke 74–78).

Meritve

Masna bilanca

31. Masna bilanca se določi s seštetjem deleža danega (radioaktivnega) odmerka, ki se izloči v urinu, iztrebkih in izdihanem zraku, ter deleža, prisotnega v tkivih, preostanku trupa in tekočini od izpiranja kletke (glej odstavek 46). Na splošno se šteje, da ustrezna skupna rekuperacija znaša > 90 % dane preskusne kemikalije (radioaktivnosti).

Absorpcija

32. Začetno oceno absorpcije je mogoče dobiti z izključitvijo deleža odmerka v prebavnem traktu in/ali iztrebkih iz določanja masne bilance. Za izračun deleža absorpcije glej odstavek 33. Za preiskovanje izločkov glej odstavke 44–49. Če natančnega obsega absorpcije po oralnem dajanju odmerka ni mogoče ugotoviti iz študij masne bilance (npr. kadar je v iztrebkih več kot 20 % danega odmerka), so morda potrebne dodatne preiskave. Te študije lahko zajemajo bodisi (1) oralno dajanje preskusne kemikalije in merjenje njene prisotnosti v žolču bodisi (2) oralno in IV-dajanje preskusne kemikalije ter merjenje njene neto količine v urinu, izdihanem zraku in trupu za vsakega od obeh načinov dajanja. V kateri koli od obeh zasnov študij se merjenje radioaktivnosti uporabi kot nadomestna metoda za analizo, specifično za kemikalijo, preskusne kemikalije in metabolitov.

33. Če se izvaja študija žolčnega izločanja, se navadno uporabi oralni način dajanja. V tej študiji je treba izvesti kanilacijo žolčnih vodov pri najmanj štirih živalih ustreznega spola (ali obeh spolov, če je to upravičeno) in jim dati enkratni odmerek preskusne kemikalije. Po dajanju preskusne kemikalije je treba izločanje radioaktivnosti/preskusne kemikalije v žolču spremljati tako dolgo, kolikor je potrebno za oceno deleža danega odmerka, ki se izloči na ta način, s tem podatkom pa se lahko neposredno izračuna obseg oralne absorpcije, in sicer z enačbo:

$$\text{delež absorpcije} = \frac{(\text{količina v žolču} + \text{urinu} + \text{izdihanem zraku} + \text{trupu brez količine v prebavnem traktu})/\text{dana količina}}{\times\ 100}$$

34. Pri nekaterih razredih preskusnih kemikalij se lahko pojavi neposredna sekrecija absorbiranega odmerka skozi črevesne sluznice. V takih primerih se šteje, da merjenje deleža odmerka v iztrebkih po oralnem dajanju pri podgani, pri kateri je bila izvedena kanilacija žolčnega voda, ni reprezentativno za neabsorbirani odmerek. Če se zdi, da se pojavlja sekrecija v črevesju, je priporočljivo, da delež absorbiranega odmerka temelji na absorpciji, izračunani s primerjavo med izločanjem po oralnem in izločanjem po IV-dajanju (nedotaknjena podgana ali podgana, na kateri je bila izvedena kanilacija žolčnega voda) (glej odstavek 35). Kadar se šteje, da je potrebna količinska opredelitev sekrecije v črevesju, je priporočljivo tudi izmeriti izločanje po IV-dajanju odmerka pri podgani, na kateri je bila izvedena kanilacija žolčnega voda.

▼M4

Biološka dostopnost

35. Biološka dostopnost se lahko določi na podlagi plazemske/krvne kinetike skupine, tretirane z oralnim dajanjem, in skupine, tretirane z IV-dajanjem, kot je opisano v odstavkih 50–52, s posebno kemijsko analizo preskusne kemikalije in/ali zadevnih metabolitov, tako da izotopsko označena preskusna kemikalija ni potrebna. Nato se izračuna biološka dostopnost (F) preskusne kemikalije ali zadevnih metabolitov, in sicer z enačbo:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (\text{odmerek}_{IV}/\text{odmerek}_{exp}),$$

pri čemer je AUC območje pod krivuljo plazemska koncentracija-čas, exp pa način dajanja pri preskusu (oralni, dermalni ali inhalacijski).

36. Pri ocenjevanju tveganja sistemskih učinkov je uporaba biološke dostopnosti strupene sestavine navadno ustreznejša od uporabe deleža absorpcije, če se sistemske koncentracije iz študij na živalih primerjajo s podobnimi podatki o biomonitoringu, pridobljenimi s študijami izpostavljenosti delavcev. Okoliščine pa lahko postanejo bolj zapletene, če so odmerki v nelinearnem območju, zato je pomembno, da se s toksikokinetičnim presejalnim preskusom določijo odmerki v linearnem območju.

Porazdelitev v tkivih

37. Poznavanje porazdelitve preskusne kemikalije in/ali njenih metabolitov v tkivih je pomembno za opredelitev ciljnih tkiv, razumevanje osnovnih mehanizmov strupenosti ter pridobivanje informacij o potencialu za kopičenje in obstojnost preskusne kemikalije in metabolitov. Delež celotnega (radioaktivnega) odmerka v tkivih in preostanku trupa je treba izmeriti vsaj ob koncu preskusa z izločanjem (npr. navadno do 7 dni po odmerku ali prej, odvisno od posebnega obnašanja preskusne kemikalije). Če se ob koncu študije v tkivih preskusne kemikalije ne odkrije (npr. ker se je zaradi kratke razpolovne dobe izločila pred koncem študije), je treba paziti, da se podatki ne razlagajo napačno. V takem primeru je treba preiskavo porazdelitve v tkivih opraviti v času najvišje plazemske/krvne koncentracije (T_{max}) ali najvišje stopnje izločanja preskusne kemikalije (in/ali metabolitov) z urinom, kot je ustrezno (glej odstavek 38). Poleg tega je morda treba tkiva zbirati tudi v dodatnih časovnih točkah, in sicer za ugotavljanje porazdelitve preskusne kemikalije in/ali njenih metabolitov v tkivih, ocenjevanje odvisnosti od časa (po potrebi), v pomoč pri določanju masne bilance in/ali če to zahteva pristojni organ. Tkiva, ki jih je treba zbrati, so med drugim jetra, maščoba, prebavni trakt, ledvice, vranica, polna kri, preostanek trupa, tkiva ciljnih organov in vsa druga tkiva (npr. ščitnica, eritrociti, razmnoževalni organi, koža, oko (zlasti pri pigmentiranih živalih)), ki so lahko pomembna pri toksikološki oceni preskusne kemikalije. Razmisliti je treba o analiziranju dodatnih tkiv, zbranih v istih časovnih točkah, da se živali kar najbolj izkoristijo ter če se v študijah subkronične ali kronične strupenosti opazi strupenost za ciljni organ. Poročati je treba tudi o koncentraciji (radioaktivnega) ostanka in razmerjih tkivo-plazma (kri).

38. Mogoče je tudi, da je treba porazdelitev v tkivih oceniti še v dodatnih časovnih točkah, na primer ob najvišji koncentraciji v plazmi/krvi (npr. T_{max}) ali najvišji stopnji izločanja z urinom, določenih na podlagi ustreznih preskusih plazemske/krvne kinetike ali preskusih z izločanjem, ali pa da to zahteva pristojni organ. Te informacije so lahko koristne za razumevanje strupenosti ter potenciala za kopičenje in obstojnost preskusne kemikalije in metabolitov. Izbiro vzorca je treba utemeljiti; vzorci za analizo so navadno enaki zgoraj navedenim (glej odstavek 37).

▼M4

39. Za študije porazdelitve v tkivih je količino radioaktivnosti mogoče določiti z disekcijo organov, homogenizacijo, sežigom in/ali solubilizacijo, čemur sledi tekočinsko scintilacijsko štetje (LSC) zajetih ostankov. Nekatere tehnike, ki so trenutno na različnih stopnjah razvoja, npr. kvantitativna avtoradiografija celega telesa in receptorska mikroskopska avtoradiografija, se lahko izkažejo kot koristne pri določanju porazdelitve preskusne kemikalije v organih in/ali tkivih (3) (4).

40. Pri načinih izpostavljenosti, ki niso oralni, je treba zbrati in analizirati specifična tkiva, kot so pljuča pri inhalacijskih študijah in koža pri dermalnih študijah. Glej odstavke 74–78.

Presnova

41. Izločke (in po potrebi plazmo) je treba zbrati, da se identificirajo nespremenjena preskusna kemikalija in metaboliti ter določijo njihove količine, kot je opisano v odstavkih 44–49. Sprejemljivo je združevanje izločkov, da se olajša identifikacija metabolitov v določeni odmerni skupini. Priporočljivo je določiti profile metabolitov iz vsakega časovnega obdobja. Če to zaradi pomanjkanja vzorcev in/ali radioaktivnosti ni mogoče, je sprejemljivo združevanje urina in iztrebkov, zbranih v različnih časovnih točkah, vendar morajo ti biti od živali istega spola in iz iste odmerne skupine. Za analiziranje urina, iztrebkov, izdihane radioaktivnosti tretiranih živali in po potrebi žolča je treba uporabiti ustrezne kvalitativne in kvantitativne metode.

42. Razumno si je treba prizadevati, da se identificirajo vsi metaboliti z vsaj 5-odstotnim deležem danega odmerka in pripravi shema presnove za preskusno kemikalijo. Identificirati je treba preskusne kemikalije, za katere je bilo pri analizi izločkov ugotovljeno, da obsegajo 5 % danega odmerka ali več. Identifikacija pomeni točno določanje strukture sestavin. Navadno se izvede z dodatno kromatografijo metabolita z znanimi standardi z dvema različnima sistemoma ali tehnikami, ki omogočajo pozitivno strukturno identifikacijo, kot so masna spektrometrija, jedrska magnetna resonanca (NMR) itd. Pri dodatni kromatografiji kromatografske tehnike, pri katerih se uporablja ista stacionarna faza z dvema različnima topilnima sistemoma, niso ustrezne za potrjevanje identitete metabolita, ki temelji na dveh metodah, saj metodi nista neodvisni. Za identifikacijo z dodatno kromatografijo je treba uporabiti dva različna in analitsko neodvisna sistema, kot sta tankoplastna kromatografija (TLC) z reverzno in normalno fazo ter tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Če je kromatografsko ločevanje ustrezne kakovosti, dodatno potrjevanje s spektroskopskimi metodami ni potrebno. Nedvoumna identifikacija pa je mogoča tudi z metodami, s katerimi se pridobivajo strukturne informacije, kot so: tekočinska kromatografija z masno spektrometrija (LC-MS) ali tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS) in spektroskopija z jedrsko magnetno resonanco.

43. Če metabolitov z vsaj 5-odstotnim deležem danega odmerka ni mogoče identificirati, je treba v končnem poročilu to utemeljiti/pojasniti. Morda je ustrezno identificirati metabolite, ki predstavljajo manj kot 5 % danega odmerka, da se izboljša razumevanje presnovne poti za oceno nevarnosti in/ali tveganja preskusne kemikalije. Če je to mogoče, je treba navesti potrditev strukture. Za to je morda treba določiti profile metabolitov v plazmi, krvi ali drugih tkivih.

▼M4

Izločanje

44. Stopnjo in obseg izločanja danega odmerka je treba določiti tako, da se izmeri delež (radioaktivnega) odmerka, pridobljen iz urina, iztrebkov in izdihanega zraka. Ti podatki pomagajo tudi pri določanju masne bilance. Količine preskusne kemikalije (radioaktivnosti), izločene z urinom, iztrebki in izdihanim zrakom, je treba določati v ustreznih časovnih intervalih (glej odstavke 47–49). Preskusi s ponavljajočimi se odmerki morajo biti ustrezno zasnovani, da je mogoče zbirati podatke o izločanju za izpolnitev ciljev iz odstavka 26. S tem se omogoči primerjave s preskusi z enkratnim odmerkom.

45. Če pilotna študija pokaže, da v izdihanem zraku ni pomembne količine preskusne kemikalije (radioaktivnosti) (v skladu z odstavkom 49), v končni študiji izdihanega zraka ni treba zbirati.

46. Za zbiranje izločkov (urina, iztrebkov in izdihanega zraka) se vsaka žival namesti v ločeno enoto za preiskave presnove. Ob koncu vsakega obdobja zbiranja (glej odstavke 47–49) je treba te enote sprati z ustreznim topilom (ta postopek se imenuje „izpiranje kletke“), da se zagotovi kar največja rekuperacija preskusne kemikalije (radioaktivnosti). Izločki se nehajo zbirati po 7 dneh ali po tem, ko je bilo pridobljenih vsaj 90 % danega odmerka, kar od tega je prej.

47. Skupne količine preskusne kemikalije (radioaktivnosti) v urinu je treba prvi dan zbiranja določati vsaj dvakrat, od tega enkrat 24 ur po odmerku, nato pa enkrat na dan do konca študije. Priporočljivo je, da se za prvi dan izbereta več kot dve časovni točki vzorčenja (npr. 6, 12 in 24 ur po odmerku). Rezultate pilotnih študij je treba analizirati, da se pridobijo informacije o drugih ali dodatnih časovnih točkah zbiranja. Razpored zbiranja je treba utemeljiti.

48. Skupne količine preskusne kemikalije (radioaktivnosti) v iztrebkih je treba ugotavljati dnevno, prvič 24 ur po dajanju odmerka, do konca študije, razen če pilotne študije kažejo, da so za zbiranje potrebne druge ali dodatne časovne točke. Drugačne razporede zbiranja je treba utemeljiti.

49. Zbiranje izdihanega CO_2 in drugih hlapnih snovi se lahko v določenem preskusu v študiji prekine, ko se v 24-urnem obdobju zbiranja izdihanega zraka v njem ugotovi manj kot 1 % danega odmerka.

Študije časovnega poteka

Plazemska/krvna kinetika

50. Namen teh študij je oceniti osnovne toksikokinetične parametre (npr. C_{max}, T_{max}, razpolovno dobo ($t_{1/2}$), AUC) preskusne kemikalije. Opravijo se lahko pri enem odmerku, navadno pa pri dveh ali več odmerkih. Odmerek je treba določiti glede na vrsto preskusa in/ali vidik, obravnavan v študiji. Kinetični podatki so lahko potrebni za reševanje vprašanj, kot je biološka dostopnost preskusne kemikalije, in/ali za pojasnitev učinka odmerka na izčistek (npr. ali je nasičenost izčistka odvisna od odmerka).

51. Za te študije je treba uporabiti najmanj štiri živali istega spola na odmerno skupino. Spol uporabljenih živali je treba utemeljiti. O uporabi obeh spolov (štirih samcev in štirih samic) je treba razmisliti, če obstajajo dokazi o pomembnih razlikah v strupenosti glede na spol.

▼M4

52. Potem ko se živalim da preskusna kemikalija (izotopsko označena), je treba vsaki živali v ustreznih časovnih točkah z ustrezno metodo odvzeti vzorce krvi. Velikost in število vzorcev krvi, ki se lahko odvzamejo eni živali, sta lahko omejena zaradi možnih učinkov večkratnega jemanja vzorcev na zdravje/fiziologijo živali in/ali občutljivosti analitske metode. Vzorce je treba analizirati za vsako posamezno žival. V nekaterih primerih (npr. pri opredeljevanju lastnosti metabolitov) je mogoče treba združiti vzorce več živali. Združene vzorce je treba jasno identificirati, združitev pa utemeljiti. Če se uporabi izotopsko označena preskusna kemikalija, je morda ustrezno analizirati skupno prisotnost radioaktivnosti. V tem primeru je treba skupno radioaktivnost analizirati v polni krvi in plazmi ali plazmi in rdečih krvničkah, da se lahko izračuna razmerje kri-plazma. V drugih primerih so morda potrebne bolj specifične preiskave, za katere je treba identificirati izhodiščno spojino in/ali metabolite, ali ocena vezave na beljakovine.

Kinetika drugih tkiv

53. Namen teh študij je pridobiti informacije o časovnem poteku ter z določitvijo količine preskusne kemikalije v različnih tkivih ugotoviti parametre, kot so način strupenega delovanja, kopičenje v organizmih in biološka obstojnost. Izbira tkiv in število časovnih točk, ki bodo ocenjene, so odvisni od obravnavanega vidika in toksikološke zbirke podatkov za preskusno kemikalijo. Pri zasnovi teh kinetičnih študij na drugih tkivih je treba upoštevati informacije, zbrane v skladu z odstavki 37–40. Pri njih se lahko uporabijo enkratni odmerki ali ponavljajoči se odmerki. Uporabljeni pristop je treba natančno utemeljiti.

54. Razlogi za izvajanje kinetičnih študij na drugih tkivih so lahko:

— dokazana podaljšana razpolovna doba v krvi, kar kaže na možnost kopičenja preskusne kemikalije v različnih tkivih, ali

— želja ugotoviti, ali je bila v določenih tkivih dosežena stabilna raven koncentracije (na primer pri študijah s ponavljajočimi se odmerki je bila morda raven dinamičnega ravnotežja preskusne kemikalije v krvi očitno dosežena, vseeno pa se želi preveriti, da je bila dosežena tudi v ciljnih tkivih).

55. Pri teh vrstah študij časovnega poteka je treba ustrezni oralni odmerek preskusne kemikalije dati vsaj štirim živalim na odmerek in časovno točko, nato pa je treba spremljati časovni potek porazdelitve v izbranih tkivih. Uporabijo se lahko živali samo enega spola, razen če je ugotovljeno, da je strupenost odvisna od spola. Od obravnavanega vidika je odvisno tudi, ali se analizirajo celotna radioaktivnost ali izhodiščna kemikalija in/ali metaboliti. Porazdelitev v tkivih je treba oceniti z ustreznimi tehnikami.

Indukcija/inhibicija encimov

56. V enem ali več naslednjih primerih so lahko potrebne študije možnih učinkov indukcije/inhibicije encimov ali biotransformacije preučevane preskusne kemikalije:

1. razpoložljivi dokazi kažejo povezavo med biotransformacijo preskusne kemikalije in povečano strupenostjo;

2. razpoložljivi podatki o strupenosti kažejo nelinearno razmerje med odmerkom in presnovo;

▼M4

3. rezultati študij za identifikacijo metabolitov kažejo obstoj potencialno strupenega metabolita, ki je morda rezultat encimske poti, ki jo je povzročila preskusna kemikalija;

4. pri pojasnjevanju učinkov, za katere se domneva povezava s pojavom indukcije encimov;

5. če se pri preskusih *in vitro* ali *in vivo* na različnih vrstah ali v različnih pogojih ugotovijo za strupenost pomembne spremembe presnovnega profila preskusne kemikalije, je morda potrebna opredelitev lastnosti udeleženih encimov (npr. encimi faze I, kot so izoencimi od citokroma P450 odvisnega monooksigenaznega sistema, encimi faze II, kot so izoencimi sulfotransferaze ali uridin difosfat glukuronozil transferaze. ali kateri koli drugi pomembni encimi). Te informacije se lahko uporabijo za oceno primernosti ekstrapolacij ene živalske vrste na drugo.

57. Za ocenjevanje sprememb v toksikokinetiki, povezanih s preskusno kemikalijo, je treba uporabiti primerne protokole študij, ki so ustrezno validirani in utemeljeni. Zasnove študij lahko na primer obsegajo ponavljajoče se odmerke neoznačene preskusne kemikalije, čemur 14. dan sledi enkraten izotopsko označen odmerek, ali ponavljajoče se odmerke izotopsko označene preskusne kemikalije in vzorčenje na 1., 7. in 14. dan za določitev presnovnih profilov. S ponavljajočimi se odmerki izotopsko označene preskusne kemikalije se lahko pridobijo tudi informacije o kopičenju v organizmih (glej odstavek 26).

DODATNI PRISTOPI

58. Z dodatnimi pristopi poleg preskusov *in vivo*, opisanih v tej preskusni metodi, se lahko pridobijo koristne informacije o absorpciji, porazdelitvi, presnovi ali izločanju preskusne kemikalije pri nekaterih vrstah.

Uporaba informacij iz preskusov *in vitro*

59. S študijami *in vitro*, v katerih so uporabljeni ustrezni preskusni sistemi, je mogoče dobiti odgovore na več vprašanj o presnovi preskusne kemikalije. Za preučevanje mogočih metabolitov se lahko uporabijo sveže izolirani ali kultivirani hepatociti in podcelične frakcije (npr. mikrosomi in citosolska frakcija ali frakcija S9) iz jeter. Za oceno tveganja je lahko zanimiva lokalna presnova v ciljnem organu, npr. pljučih. Za te namene so lahko koristne mikrosomske frakcije ciljnih tkiv. Študije z mikrosomi so lahko koristne za obravnavanje morebitnih razlik med spoloma in glede na fazo življenja ter za opredelitev encimskih parametrov (K_m in V_{max}), ki so lahko v pomoč pri ocenjevanju odvisnosti presnove od odmerka v povezavi s stopnjami izpostavljenosti. Poleg tega so lahko mikrosomi v pomoč pri identifikaciji posebnih mikrosomskih encimov, ki sodelujejo pri presnovi preskusne kemikalije, kar je lahko pomembno pri ekstrapolaciji ene živalske vrste na drugo (glej tudi odstavek 56). Prav tako se lahko preuči potencial za indukcijo biotransformacije, in sicer s podceličnimi frakcijami (npr. mikrosomi in citosoli) iz jeter živali, predhodno tretiranih s preiskovano preskusno kemikalijo, *in vitro* v študijah indukcije hepatocitov, ali na podlagi določenih celičnih linij, v katerih so izraženi ustrezni encimi. V nekaterih okoliščinah in ustreznih pogojih se lahko za določanje možnih razlik pri biotransformaciji med vrstami predvidi uporaba podceličnih frakcij iz človeških tkiv. Rezultati iz preiskav *in vitro* se lahko uporabijo tudi pri izdelavi modelov PBTK (5).

▼M4

60. S študijami dermalne absorpcije *in vitro* se lahko pridobijo dodatne informacije za opredelitev absorpcije (6).

61. Primarne celične kulture iz jetrnih celic in rezin svežega tkiva se lahko uporabijo za obravnavo podobnih vprašanj kot pri jetrnih mikrosomih. V nekaterih primerih je mogoče na konkretna vprašanja odgovoriti s celičnimi linijami z opredeljenimi izraženimi ustreznimi encimi ali spremenjenimi celičnimi linijami. V nekaterih primerih je lahko koristno preučevati inhibicijo in indukcijo posebnih izoencimov citokroma P450 (npr. CYP1A1, 2E1, 1A2 in drugih) in/ali encimov faze II z izhodiščno spojino v okviru študij *in vitro*. Pridobljene informacije so lahko koristne za spojine s podobno strukturo.

Uporaba toksikokinetičnih podatkov iz študij strupenosti kot dodatnih informacij

62. Analiza vzorcev krvi, tkiva in/ali izločkov, pridobljenih med izvajanjem drugih študij strupenosti, lahko zagotovi podatke o biološki dostopnosti, spremembah plazemske koncentracije v odvisnosti od časa (AUC, C_{max}), potencialu za kopičenje v organizmih, stopnjah izčistkov ter spremembah v presnovi in kinetiki glede na spol ali fazo življenja.

63. Zasnova študije se lahko prilagodi, da se poiščejo odgovori na vprašanja v zvezi z: nasičenostjo absorpcije, potmi biotransformacije ali izločanja pri večjih odmerkih; delovanjem novih presnovnih poti pri večjih odmerkih in omejenostjo strupenih metabolitov na večje odmerke.

64. Drugi vidiki ocene nevarnosti bi lahko bili na primer:

— s starostjo povezana občutljivost zaradi razlik v stanju krvno-možganske pregrade, ledvic in/ali zmožnosti razstrupljanja,

— občutljivost podpopulacij zaradi razlik v zmožnostih biotransformacije ali drugih toksikokinetičnih razlik,

— stopnja izpostavljenosti fetusa pri transplacentarnem prenosu kemikalij ali novorojene živali prek laktacije.

Uporaba toksikokinetičnega modeliranja

65. Toksikokinetični modeli lahko prispevajo k različnim vidikom ocenjevanja nevarnosti in tveganja, na primer pri napovedovanju sistemske izpostavljenosti in odmerka za notranje tkivo. Poleg tega se lahko z njimi obravnavajo konkretna vprašanja o načinu delovanja, lahko pa so tudi osnova za ekstrapolacijo na druge vrste, načine izpostavljenosti in vzorce dajanja odmerkov ter ocenjevanje tveganja za ljudi. Podatki, koristni za izdelavo modelov PBTK za preskusno kemikalijo za dano vrsto, vključujejo 1. porazdelitvene koeficiente, 2. biokemične konstante in fiziološke parametre, 3. parametre absorpcije pri različnih načinih izpostavljenosti in 4. kinetične podatke *in vivo* za ovrednotenje modela (npr. parametri izčistkov za ustrezne poti izločanja (> 10 %), K_m in V_{max} za presnovo). Preskusne podatke, uporabljene pri izdelavi modela, je treba pridobiti z znanstveno utemeljenimi metodami, rezultate modela pa validirati. Parametri, specifični za preskusno kemikalijo in vrsto, kot so stopnje absorpcije, porazdelitev med krvjo in tkivom ter konstante hitrosti presnove, se pogosto določajo, da bi se olajšala izdelava nerazdelčnih modelov ali modelov, ki temeljijo na fiziologiji (7).

▼M4

PODATKI IN POROČANJE

66. Priporočljivo je, da poročilo o študiji vsebuje kazalo.

Osrednji del poročila

67. V osrednjem delu poročila morajo biti predstavljene informacije, ki jih obsega ta preskusna metoda. Razčlenjeno mora biti na oddelke in odstavke, kot je navedeno v nadaljevanju.

Povzetek

68. Ta oddelek poročila o študiji mora vsebovati povzetek zasnove študije in opis uporabljenih metod. V njem morajo biti poudarjene ključne ugotovitve v zvezi z masno bilanco, lastnostmi in pomembnostjo metabolitov, ostanki tkiv, stopnjo izčistkov, potencialom za kopičenje v organizmih, razlikami glede na spol itd. Povzetek mora biti dovolj podroben, da omogoča oceno ugotovitev.

Uvod

69. Ta del poročila mora vsebovati cilje študije, razloge zanjo, njeno zasnovo ter ustrezne vire in pretekle podatke o področju.

Materiali in metode

70. V tem oddelku poročila morajo biti podrobno navedene vse ustrezne informacije, vključno z naslednjimi:

(a) Preskusna kemikalija

V tem pododdelku je treba identificirati preskusno kemikalijo in navesti: kemijsko ime, molekulsko strukturo, kvalitativno in kvantitativno opredelitev kemijske sestave, kemijsko čistost ter po možnosti vrsto in količino nečistot. Vključiti je treba tudi informacije o fizikalnih/kemijskih lastnostih, vključno z agregatnim stanjem, barvo, bruto koeficientom topnosti in/ali porazdelitvenim koeficientom, stabilnostjo in po potrebi jedkostjo. Če je ustrezno, je treba navesti informacije o izomerih. Če je preskusna kemikalija izotopsko označena, je treba v ta poddel vključiti naslednje informacije: vrsto radionuklida, položaj oznake, specifično aktivnost in radiokemijsko čistost.

Opisati je trebe vse nosilce, redčila, snovi za upočasnitev sedimentacije v suspenziji, emulgatorje ali druge snovi, uporabljene pri dajanju preskusne kemikalije.

(b) Preskusne živali

V tem pododdelku je treba navesti informacije o preskusnih živalih, vključno z izbranimi vrstami in razlogi za njihovo uporabo, sevom in starostjo ob začetku študije, spolom in telesno težo, zdravstvenim stanjem in oskrbo živali.

(c) Metode

V tem poddelu je treba navesti podrobne informacije o zasnovi študije in uporabljeni metodologiji. Vsebovati mora naslednje informacije:

1. utemeljitev spremembe načina izpostavljenosti in pogojev izpostavljenosti, če je ustrezno;

▼M4

2. utemeljitev izbranih velikosti odmerkov;

3. opis pilotnih študij, uporabljenih za preskusno zasnovo nadaljnjih študij, če je ustrezno. Predložiti je treba podporne podatke pilotne študije;

4. opis priprave raztopin za odmerjanje z navedbo vrste topila ali nosilca, če je bil uporabljen;

5. število tretiranih skupin in število živali na skupino;

6. velikosti in količino odmerkov (in specifična aktivnost odmerka, če se uporabi radioaktivnost);

7. načine in metode dajanja odmerkov;

8. pogostnost dajanja odmerkov;

9. obdobje postenja (če se uporabi);

10. skupno radioaktivnost na žival;

11. opis ravnanja z živalmi;

12. opis jemanja vzorcev in ravnanja z njimi;

13. analitske metode, uporabljene za ločevanje, določanje količine in identifikacijo metabolitov;

14. mejo zaznavnosti za uporabljene metode;

15. druge uporabljene preskusne meritve in postopke (vključno z validacijo metod za analizo metabolitov).

(d) Statistična analiza

Če se za analizo ugotovitev študije uporabi statistična analiza, je treba vključiti zadostne informacije o metodi analize in uporabljenem računalniškem programu, da lahko neodvisni ocenjevalec/statistik analizo znova oceni in ponovi.

Če se uporabijo študije sistemskega modeliranja, kot je PBTK, je treba v predstavitev modelov vključiti popoln opis modela, da se lahko izvedeta neodvisna ponovitev in validacija modela (glej odstavek 65 in Dodatek: opredelitev pojmov).

Rezultati

71. Vse podatke je treba povzeti in predstaviti v preglednicah z ustrezno statistično oceno ter jih opisati v tem delu. Podatke, pridobljene pri merjenju radioaktivnosti, je treba povzeti in predstaviti, kot je ustrezno za študijo, navadno v ekvivalentih mikrogramov ali miligramov na maso vzorca, lahko pa se uporabijo tudi druge enote. Ta del mora vključevati grafične ponazoritve ugotovitev, izvode reprezentativnih kromatografskih in spektrometričnih podatkov, identifikacijo/količinsko opredelitev metabolitov in predlagane presnovne poti, vključno z molekulsko strukturo metabolitov. Poleg tega je treba po potrebi v ta del vključiti naslednje informacije:

1. količino in delež rekuperacije radioaktivnosti v urinu, iztrebkih, izdihanem zraku ter v urinu in iztrebkih ob izpiranju kletk;

— pri dermalnih študijah je treba vključiti tudi podatke o rekuperaciji preskusne kemikalije iz tretirane kože in ob umivanju kože, ostanku radioaktivnosti na aparaturi, ki pokriva kožo, in v enoti za preiskave presnove ter rezultate študije z umivanjem kože. Za več podrobnosti glej odstavke 74–77,

▼M4

— pri inhalacijskih študijah je treba vključiti tudi podatke o rekuperaciji preskusne kemikalije iz pljuč in nosnih tkiv (8). Za več podrobnosti glej odstavek 78;

2. porazdelitev v tkivih, izraženo kot delež danega odmerka in koncentracija (ekvivalenti mikrogramov na gram tkiva), in razmerja tkivo-kri ali tkivo-plazma;

3. materialno bilanco, izdelano na podlagi vsake študije, ki vključuje analizo telesnih tkiv in izločkov;

4. plazemske koncentracije in toksikokinetične parametre (biološka dostopnost, AUC, Cmax, Tmax, izčistek, razpolovna doba) po tem, ko je bil dan odmerek preskusne kemikalije v skladu z ustreznimi načini izpostavljenosti;

5. stopnjo in obseg absorpcije preskusne kemikalije po tem, ko je bil dan odmerek v skladu z ustreznimi načini izpostavljenosti;

6. količine preskusne kemikalije in metabolitov (izražene kot delež danega odmerka), zbranih v izločkih;

7. sklicevanje na podatke iz dodatka, ki vsebujejo podatke o posamezni živali za vse končne točke meritev (npr. dajanje odmerka, delež rekuperacije, koncentracije, toksikokinetični parametri itd.);

8. grafično predstavitev predlaganih presnovnih poti in molekulskih struktur metabolitov.

Razprava in sklepi

72. Avtorji morajo v tem oddelku:

1. na podlagi rezultatov v zvezi s presnovo in izločanjem preskusne kemikalije predlagati presnovno pot;

2. preučiti morebitne razlike glede na vrsto in spol v zvezi z izločanjem in/ali biotransformacijo preskusne kemikalije;

3. v preglednici predstaviti in preučiti identifikacijo in pomembnost metabolitov, stopnje izčistkov, potencial za kopičenje v organizmih, ravni ostankov tkiv izhodiščne snovi in/ali metabolitov ter morebitne od odmerka odvisne spremembe toksikokinetičnih parametrov, kot je ustrezno;

4. v ta del vključiti vse ustrezne toksikokinetične podatke, pridobljene med izvajanjem študij strupenosti;

5. oblikovati jedrnat sklep, ki ga je mogoče podpreti z ugotovitvami študije;

6. (po potrebi ali kot je ustrezno) dodati oddelke.

73. Za vključitev podpornih bibliografskih informacij, preglednic, grafičnih predstavitev, dodatkov itd. je treba uporabiti dodatne oddelke.

▼M4

DRUGI NAČINI IZPOSTAVLJENOSTI

Dermalni način

Dermalno tretiranje

74. Ta oddelek vsebuje posebne informacije o preiskovanju toksikokinetike preskusne kemikalije pri dermalnem načinu dajanja. Več o dermalni absorpciji je na voljo v poglavju B.44 te priloge (Absorpcija skozi kožo: metoda *in vivo* (9)). Za druge končne točke, kot sta porazdelitev in presnova, se lahko uporabi ta preskusna metoda B.36. Za dermalno tretiranje je treba uporabiti eno ali več velikosti odmerkov preskusne kemikalije. Preskusna kemikalija (npr. čista, razredčena ali formulirana snov, ki vsebuje preskusno kemikalijo in se nanese na kožo) mora biti enaka (ali realističen nadomestek) tisti, ki so ji lahko izpostavljeni ljudje ali druge potencialne ciljne vrste. Velikosti odmerkov je treba določiti v skladu z odstavki 20–26 te preskusne metode. Med dejavniki, ki bi jih bilo mogoče upoštevati pri izbiri dermalnega odmerka, so pričakovana izpostavljenost človeka in/ali odmerki, pri katerih je bila v drugih študijah dermalne strupenosti ugotovljenost strupenost. Dermalne odmerke je treba po potrebi raztopiti v ustreznem nosilcu in nanesti v količini, ustrezni za nanos odmerka. Tik pred začetkom preskusa je treba preskusnim živalim ostriči dlako s hrbtnega dela trupa. Dlaka se lahko tudi obrije, vendar je treba to opraviti približno 24 ur pred preskusom. Med striženjem ali britjem dlake je treba paziti, da se koža ne odrgne, kar bi lahko spremenilo njeno prepustnost. Za nanos preskusne kemikalije je treba ostriči oziroma obriti približno 10 % površine telesa. Pri zelo strupenih kemikalijah je lahko površina pokritosti manjša od 10 %, vendar mora biti s tanko in enakomerno plastjo pokrite čim več površine. Površina tretiranja mora biti enaka v vseh preskusnih skupinah z dermalnim tretiranjem. Površine, ki se tretirajo, je treba pokriti z ustrezno zaščito, ki bo ostala na mestu. Živali morajo biti nastanjene posamično.

75. Študijo z umivanjem kože je treba opraviti, da se oceni, koliko nanesenega odmerka preskusne kemikalije se lahko odstrani s kože z umivanjem tretirane kožne površine z blagim milom in vodo. Ta študija je lahko tudi v pomoč pri določanju masne bilance pri dermalnem načinu dajanja preskusne kemikalije. Pri tej študiji z umivanjem kože je treba na dve živali nanesti enkraten odmerek preskusne kemikalije. Velikost odmerka se izbere v skladu z odstavkom 23 te preskusne metode (glej tudi odstavek 76 o trajanju stika s kožo). Določiti je treba, koliko preskusne kemikalije se pridobi iz vode z milom, s katero se je umivala koža, da se oceni učinkovitost njenega odstranjevanja z umivanjem.

76. Preskusno kemikalijo je treba nanesti na kožo in jo na njej pustiti vsaj 6 ur, razen če to ni mogoče zaradi jedkosti. Ko se zaščita odstrani, je treba tretirano površino umiti v skladu s postopkom, opisanim v študiji z umivanjem kože (glej odstavek 75). Zaščito in vodo z milom, s katero je bila umita koža, je treba analizirati, da se ugotovi prisotnost ostankov preskusne kemikalije. Ob koncu študij je treba vsako žival humano usmrtiti v skladu z virom (2), tretirano kožo pa odstraniti. Ustrezen del tretirane kože je treba analizirati, da se določijo ostanki preskusne kemikalije (radioaktivnosti).

77. Za toksikokinetično oceno farmacevtskih izdelkov so v skladu z ustrezno zakonodajno ureditvijo morda potrebni drugačni postopki.

▼M4

Inhalacijski način

78. Uporabiti je treba eno samo koncentracijo preskusne kemikalije (ali po potrebi več). Koncentracije je treba določiti v skladu z odstavki 20–26 te preskusne metode. Tretiranje z vdihavanjem je treba izvajati z aparaturo z nosnim stožcem ali aparaturo za izpostavljanje glave, da se prepreči absorpcija prek drugih načinov izpostavljenosti (8). Če se uporabijo drugi pogoji izpostavljenosti z vdihavanjem, je treba to izbiro utemeljiti in dokumentirati. Trajanje izpostavljenosti z vdihavanjem je treba opredeliti; navadno traja 4–6 ur.

VIRI:

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Pariz.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Pariz.

(3) Solon, E. G., Kraus, L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

(4) Stumpf, W. E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40.

(5) Loizou, G., Spendiff, M., Barton, H. A., Bessems, J., Bois, F. Y., d'Yvoire, M. B., Buist. H., Clewell, H. J. 3., Meek, B., Gundert-Remy, U., Goerlitz, G., Schmitt, W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

(6) Poglavje B.45 te priloge, Absorpcija skozi kožo: metoda *in vitro*.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Pariz.

(9) Poglavje B.44 te priloge, Absorpcija skozi kožo: metoda *in vivo*.

(10) Barton, H. A., idr. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

(11) Gibaldi, M., in Perrier, D., (1982), Pharmacokinetics, 2. izdaja, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Dodatek

OPREDELITEV POJMOV

Absorpcija: procesi sprejemanja kemikalij v tkiva ali skozi tkiva. Nanaša se na izhodiščno spojino in vse njene metabolite. Ne sme se mešati z „biološko dostopnostjo“.

Kopičenje v organizmih (bioakumulacija): povečanje količine preskusne kemikalije skozi čas v tkivih (navadno maščobnih tkivih po ponavljajoči se izpostavljenosti); če je stopnja vnosa preskusne kemikalije v telo višja od stopnje njenega izločanja, se preskusna kemikalija kopiči v organizmu in lahko doseže strupene koncentracije.

ADME: kratica za „absorpcija, porazdelitev, presnova in izločanje“.

AUC: (območje pod krivuljo plazemska koncentracija-čas): območje pod krivuljo na grafičnem prikazu, ki predstavlja koncentracijo preskusne kemikalije v plazmi v odvisnosti od časa. Predstavlja skupno količino preskusne kemikalije, ki jo telo absorbira v vnaprej določenem obdobju. V linearnih pogojih je AUC (od časa nič do neskončnosti) sorazmerna s skupno količino preskusne kemikalije, ki jo telo absorbira, ne glede na stopnjo absorpcije.

Avtoradiografija: (avtoradiografija celega telesa): pri tej tehniki, s katero se kvalitativno in/ali kvantitativno določa mesto radioaktivne preskusne kemikalije v tkivu, se uporablja rentgensko slikanje, v zadnjem času pa tudi digitalno slikanje s fosforno ploščo, pri čemer se slika oddano sevanje v notranjosti predmeta študije, s tem pa izotopsko označene molekule ali njihovi deli postanejo vidni. Kvantitativna avtoradiografija celega telesa ima lahko v primerjavi z disekcijo organov nekatere prednosti pri ocenjevanju porazdelitve preskusne kemikalije, skupne rekuperacije in ločljivosti radioaktivne snovi v tkivih. Ena od pomembnih prednosti je na primer, da se lahko ta tehnika pri modelu s pigmentiranimi živalmi uporabi za oceno morebitne asociacije preskusne kemikalije z melaninom, ki lahko veže nekatere molekule. Čeprav lahko z njo dobimo koristne preglede veznih mest z visoko zmogljivostjo in nizko afiniteto na ravni celega telesa, je lahko omejena pri prepoznavanju konkretnih ciljnih mest, kot so receptorska vezna mesta, kjer sta za zaznavanje potrebni razmeroma visoka ločljivost in velika občutljivost. Če se uporabi avtoradiografija, je treba preskuse za določanje masne bilance dane spojine opraviti na skupini ali v študiji, ločeni od preskusa določanja porazdelitve v tkivu, pri katerih se vsi izločki (ki lahko vključujejo tudi izdihan zrak) in celotni trupi homogenizirajo in analizirajo s tekočinskim scintilacijskim štetjem.

Žolčno izločanje: izločanje prek žolčnih vodov.

Bioakumulacija: glej „kopičenje v organizmih“.

Biološka dostopnost: del danega odmerka, ki doseže sistemski obtok ali je na voljo na mestu fiziološke aktivnosti. Navadno se biološka dostopnost preskusne kemikalije nanaša na izhodiščno spojino, lahko pa tudi na njene metabolite. Pri tem se upošteva samo ena kemijska oblika. *Opomba*: biološka dostopnost in absorpcija nista sopomenki. Razlika med, na primer, oralno absorpcijo (tj. prisotnost v črevesni steni in portalnem obtoku) in biološko dostopnostjo (tj. prisotnost v sistemskem krvnem obtoku in tkivih) lahko med drugim izhaja iz kemijske razgradnje, ki je posledica presnove v črevesni steni, ali prenosa odtoka nazaj v črevesno svetlino, ali predsistemske presnove v jetrih (10). Biološka dostopnost strupene sestavine (izhodiščne spojine ali metabolita) je bistveni parameter pri oceni tveganja za ljudi (ekstrapolacija velikega na majhen odmerek, ekstrapolacija na druge načine dajanja), da se iz zunanjega NOAEL ali BMD (uporabljeni odmerek) izpelje notranja vrednost. Za učinke na jetra po oralnem dajanju zadošča oralna absorpcija. Za vse učinke, razen učinkov na vstopnem mestu, pa je biološka dostopnost v primerjavi z absorpcijo navadno zanesljivejši parameter za nadaljnjo uporabo v oceni tveganja.

▼M4

Biološka obstojnost: glej „obstojnost“.

Biotransformacija: (navadno encimska) kemična pretvorba preiskovane preskusne kemikalije v telesu v drugo kemikalijo. Sopomenka za „presnovo“.

C_{max}: bodisi najvišja (plazemska/serumska) koncentracija v krvi po dajanju odmerka bodisi največje izločanje (v urinu ali iztrebkih) po dajanju odmerka.

Stopnja izčistka: kvantitativno merilo stopnje odstranjevanja preskusne kemikalije iz krvi, plazme ali določenih tkiv na enoto časa.

Razdelek: strukturni ali biokemični del (ali enota) telesa, tkiva ali celice, ki je ločen od preostanka.

Načini razstrupljanja: vrsta korakov, ki vodi do odstranitve strupenih kemikalij iz telesa, bodisi s presnovno spremembo bodisi z izločanjem.

Porazdelitev: razpršenost preskusne kemikalije in njenih derivatov po organizmu.

Encimi/izoencimi: beljakovine, ki pospešujejo kemične reakcije. Izoencimi so encimi, ki pospešujejo podobne kemične reakcije, vendar imajo drugačno zaporedje aminokislin.

Encimski parametri: K_m: Michaelisova konstanta in V_{max}: največja hitrost.

Izločanje: procesi, s katerimi se dana preskusna kemikalija in/ali njeni metaboliti odstranijo iz telesa.

Eksogeno: izvirajoče ali ustvarjeno zunaj organizma ali sistema.

Ekstrapolacija: sklepanje o eni ali več neznanih vrednostih na podlagi tega, kar je znano ali opaženo.

Razpolovna doba ($t_{1/2}$): čas, ki je potreben, da se koncentracija preskusne kemikalije v razdelku zmanjša za polovico. Navadno se nanaša na plazemsko koncentracijo ali količino preskusne kemikalije v celem telesu.

Indukcija/indukcija encimov: sinteza encimov kot odziv na okoljski dražljaj ali induktor.

Linearnost/linearna kinetika: pri kinetiki je proces linearen, ko so vse stopnje prenosa med razdelki sorazmerne s prisotnimi količinami ali koncentracijami, tj. proces prvega reda. Količine izčistkov in porazdelitev so zato konstantne, kar velja tudi za razpolovne dobe. Dosežena koncentracija je sorazmerna z velikostjo odmerka (izpostavljenostjo), kopičenje pa je lažje napovedati. Ali gre za linearnost ali nelinearnost, se lahko oceni s primerjanjem ustreznih parametrov, npr. AUC, po različnih odmerkih ali po enkratni in ponavljajoči se izpostavljenosti. Če se ne ugotovi odvisnost od velikosti odmerka, je to lahko znak nasičenosti encimov, ki sodelujejo pri presnovi spojine, povečanje AUC po ponavljajoči se izpostavljenosti v primerjavi z enkratno izpostavljenostjo je lahko znak inhibicije presnove, zmanjšanje AUC pa znak indukcije presnove (glej tudi vir (11)).

Masna bilanca: količinska razlika med preskusno kemikalijo, ki vstopa v sistem, in preskusno kemikalijo, ki zapušča sistem.

▼M4

Materialna bilanca: glej „masna bilanca“.

Mehanizem (način) strupenosti/mehanizem (način) delovanja: mehanizem delovanja se nanaša na konkretno biokemično interakcijo, s katero preskusna kemikalija povzroči učinek. Način delovanja se nanaša na splošnejše poti, ki vodijo k strupenosti preskusne kemikalije.

Presnova: sopomenka za „biotransformacijo“.

Metaboliti: produkti presnove ali presnovnih procesov.

Oralna absorpcija: delež odmerka preskusne kemikalije, ki se absorbira z mesta dajanja (npr. iz prebavnega trakta). Ta ključni parameter se lahko uporabi za razumevanje dela dane preskusne kemikalije, ki doseže portalno veno, nato pa jetra.

Porazdelitveni koeficient: imenovan tudi distribucijski koeficient; merilo različne topnosti kemikalije v dveh topilih.

Najvišja (plazemska/serumska) raven v krvi: najvišja (plazemska/serumska) koncentracija v krvi po dajanju odmerka (glej tudi „C_{max}“).

Obstojnost (biološka obstojnost): dolgoročna prisotnost kemikalije (v biološkem sistemu) zaradi odpornosti na razgradnjo/izločanje.

Navzkrižno branje: informacije o končnih točkah za eno ali več kemikalij se uporabijo za napovedovanje končne točke za ciljno kemikalijo.

Receptorska mikroskopska avtoradiografija (ali receptorska mikroavtoradiografija): ta tehnika se lahko uporabi za preiskovanje ksenobiotične interakcije s konkretnimi tkivnimi mesti ali celičnimi populacijami, na primer pri študijah receptorske vezave ali posebnega načina delovanja, pri katerih sta lahko potrebni visoka ločljivost in velika občutljivost, ki pa morda nista mogoči z drugimi tehnikami, kakršna je na primer avtoradiografija celega telesa.

Način dajanja (oralni, IV, dermalni, inhalacijski itd.): nanaša se na način, kako se kemikalije vnašajo v telo (npr. oralno z gavažo, oralno s hrano, dermalno, z vdihavanjem, intravenozno itd.).

Nasičenost: stanje, pri katerem eden ali več kinetičnih procesov (npr. absorpcija, presnova ali čiščenje) poteka najintenzivneje (procesi so „nasičeni“).

Občutljivost: zmožnost metode ali instrumenta, da razlikuje med meritvenimi odzivi, ki predstavljajo različne stopnje preiskovane spremenljivke.

(Plazemska) raven dinamičnega ravnotežja v krvi: neravnotežno stanje odprtega sistema, v katerem vse sile, ki delujejo na sistem, natančno izenačujejo nasprotne sile, tako da koncentracije vseh sestavnih delov ostajajo nespremenjene, čeprav snov teče skozi sistem.

Sistemsko modeliranje (na fiziologiji temelječe toksikokinetično, na farmakokinetiki temelječe, na fiziologiji temelječe farmakokinetično, na biologiji temelječe itd.): abstraktni model, ki uporablja matematični jezik za opisovanje vedenja sistema.

Ciljno tkivo: tkivo, v katerem se kaže glavni škodljivi učinek strupene snovi.

▼**M4**

Preskusna kemikalija: kemikalija ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Porazdelitev v tkivih: reverzibilno gibanje preskusne kemikalije z enega mesta v telesu na drugo. Porazdelitev v tkivih se lahko preiskuje z disekcijo organov, homogenizacijo, sežigom in tekočinskim scintilacijskim štetjem ali s kvalitativno in/ali kvantitativno avtoradiografijo celega telesa. Prva metoda je primerna za pridobivanje podatkov o koncentraciji in deležu rekuperacije iz tkiv in preostankov trupov istih živali, vendar ima lahko nezadostno ločljivost za vsa tkiva in morda ne zagotavlja najboljše možne ravni skupne rekuperacije (< 90 %). Za opredelitev druge metode glej zgoraj.

$\mathbf{T_{max}}$: čas, potreben za dosego C_{max}.

Toksikokinetika (farmakokinetika): področje, ki preučuje absorpcijo, porazdelitev, presnovo in izločanje kemikalij skozi čas.

Validacija modelov: postopek ocenjevanja, ali model ustrezno in dosledno opisuje vse razpoložljive toksikokinetične podatke. Modeli se lahko ocenjujejo s statistično in vizualno primerjavo napovedi modela s preskusnimi vrednostmi glede na skupno neodvisno spremenljivko (npr. čas). Obseg ocene mora biti utemeljen glede na predvideno uporabo modela.

▼B

B.37 **ZAPOZNELA NEVROTOKSIČNOST ORGANOFOSFORNIH SNOVI PO AKUTNI IZPOSTAVLJENOSTI**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih učinkov snovi je pomembno upoštevati potencial nekaterih razredov snovi, da povzročijo posebne vrste nevrotoksičnosti, ki se morda ne bi odkrile v drugih študijah toksičnosti. Nekatere organofosforne snovi, za katere je bilo ugotovljeno, da povzročajo zapoznelo nevrotoksičnost, bi morale biti predmet takšnega ocenjevanja.

Izločilne študije *in vitro* bi se lahko uporabile pri določanju tistih snovi, ki lahko povzročijo zapoznelo polinevropatijo; vendar negativni izsledki študij *in vitro* ne zagotavljajo dokazov, da preskusna snov ni nevrotoksikant.

Glej del B splošnega uvoda.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Organofosforne snovi vključujejo nenabite organofosforne estre, tioestre ali anhidride organofosfornih, organofosfoničnih ali organofosforamidnih kislin ali sorodnih fosforotiotskih, fosfonotiotskih ali fosforotioamidnih kislin ali druge snovi, ki lahko povzročijo zapoznelo nevrotoksičnost, ki je včasih opažena v tem razredu snovi.

Zapoznela nevrotoksičnost je sindrom, povezan z dolgotrajnim zapoznelim nastopom ataksije, distalnimi aksonopatijami hrbtenjače in perifernega živčevja ter z inhibicijo in staranjem nevropatske ciljne esteraze (NTE) v živčnem tkivu.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčna snov se lahko preskuša na pozitivni kontrolni skupini kot dokaz, da se tudi v preskusnih laboratorijskih okoliščinah odziv preskušane vrste ni bistveno spremenil.

Primer široko uporabljenega nevrotoksikanta je tri-o-tolil fosfat (CAS 78-30-8, Einecs 201-103-5, nomenklatura CAS: tris(2-metilfenil)ester fosforjeve kisline), znan tudi kot tris-o-krezilfosfat.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov se daje oralno in z enkratnim odmerkom domačim kokošim, ki so bile zaščitene pred akutnimi holinergičnimi učinki, če je to primerno. Živali se opazujejo 21 dni za morebitne vedenjske nepravilnosti, ataksijo in paralizo. Navadno se od 24 do 48 ur po vnosu odmerka izvedejo biokemične analize, zlasti inhibicija nevropatske ciljne erastaze (NTE), na naključno izbranih kokoših iz vsake skupine. Enaindvajset dni po izpostavljenosti se usmrtijo druge kokoši in se izvede histopatološka preiskava izbranega živčnega tkiva.

▼B

1.5 OPIS PRESKUSNE METODE

1.5.1 **Priprave**

Zdrave, mlade, odrasle kokoši, ki ne kažejo znakov virusnih obolenj, niso tretirane s snovmi, ki bi vplivala na rezultat preskusa, in ki ne kažejo znakov nenavadnega obnašanja, je treba naključno razvrstiti v skupino, ki bo tretirana, in v kontrolno skupino ter jih aklimatizirati na laboratorijske razmere najmanj 5 dni pred začetkom študije.

Treba je uporabiti kletke ali ograde, ki so dovolj velike, da omogočajo prosto gibanje kokoši in olajšajo opazovanje obnašanja živali.

Običajno se preskusna snov vnaša po oralni poti z gastrično sondo, želatinastimi kapsulami ali primerljivo metodo. Tekočine se lahko vnašajo nerazredčene ali raztopljene v ustreznem nosilcu, kakršno je na primer koruzno olje; če je mogoče, je treba trdne snovi raztopiti, ker se utegne zgoditi, da se veliki odmerki v želatinastih kapsulah ne absorbirajo učinkovito. Pri nevodnih nosilcih je treba poznati njihove toksične značilnosti ali jih v nasprotnem določiti pred začetkom preskusa.

1.5.2 **Preskusni pogoji**

1.5.2.1 Poskusne živali

Priporoča se uporaba mladih odraslih domačih kokoši nesnic *{Gallus gallus domesticus),* ki so stare od 8 do 12 mesecev. Uporabiti je treba kokoši pasem standardne velikosti in sevov, običajno vzrejene v okoliščinah, ki kokošim dovoljujejo svobodno gibanje.

1.5.2.2 Število in spol

Poleg skupine, ki bo tretirana, je treba uporabiti kontrolno skupino, ki ji je vnesen zgolj nosilec, in tudi pozitivno kontrolno skupino. Kontrolno skupino, ki ji je vnesen zgolj nosilec, je treba tretirati enako kakor skupino, ki bo tretirana, razen da se živalim ne da preskusna snov.

Vsaka skupina ptic mora biti sestavljena iz zadosti kokoši, tako da se lahko usmrti najmanj šest ptic za biokemične analize (tri na vsakega od obeh časovnih terminov opazovanja) in da lahko šest primerkov preživi 21-dnevno obdobje opazovanja za patološke preiskave.

Pozitivna kontrolna skupina se lahko preskuša hkrati, lahko pa je tudi nedavno preskušena kontrolna skupina. Sestavljena naj bo iz vsaj šestih kokoši, tretiranih z znanim zapoznelim nevrotoksikantom, od katerih so tri namenjene za biokemične analize in tri za patološke preiskave. Priporoča se redno dopolnjevanje predhodnih podatkov. Nove pozitivne kontrolne podatke je treba razviti vsakokrat, ko laboratorij, ki izvaja preskuse, spremeni katerega od bistvenih elementov preskusa (npr. sev, vrsta krme, nastanitvene razmere).

▼B

1.5.2.3 Velikosti odmerkov

Za določitev velikosti odmerka, ki se bo uporabil v glavni študiji, je treba izvesti predhodno študijo z ustreznim številom kokoši in skupin velikosti odmerkov. V tej predhodni študiji, namenjeni določitvi primernega odmerka za glavno študijo, se praviloma pričakuje nekaj smrtnosti. Da bi se izognili smrti zaradi akutnih holinergičnih učinkov, se lahko uporabi atropin ali kakšno drugo zaščitno sredstvo, za katero je znano, da ne moti zapoznelih nevrotoksičnih odzivov. Za določitev največjega nesmrtonosnega odmerka preskusne snovi so na voljo številne metode (glej metodo B.1 bis). Pri izbiri odmerka so lahko v veliko pomoč podatki iz predhodnih študij na kokoših ali druge toksikološke informacije.

Odmerek preskusne snovi v glavni študiji naj bo čim večji, pri čemer je treba upoštevati rezultate predhodne študije za izbiro odmerka in najvišji mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže. Ne glede na število smrtnih primerov, ki se lahko pojavijo, pa naj bi preživelo zadosti živali za izvedbo biokemičnih analiz (šest) in histoloških preiskav (šest) do 21. dneva preskusa. Za preprečitev smrti zaradi akutnih holinergičnih učinkov je treba uporabiti atropin ali kakšno drugo zaščitno sredstvo, ki ne moti zapoznelih nevrotoksičnih odzivov.

1.5.2.4 Mejni preskus

Če preskus, izveden v skladu z opisanimi postopki za to študijo in pri stopnji odmerka, ki znaša najmanj 2 000 mg/kg telesne teže/dan, ne povzroči nobenih očitnih toksičnih učinkov in če podatki o strukturno sorodnih snoveh ne kažejo na pojav toksičnosti, študije z uporabo večjega odmerka ni treba izvesti. Mejni preskus se ne uporabi samo, če človeška izpostavljenost kaže na potrebo po uporabi večjega odmerka.

1.5.2.5 *Obdobje opazovanja*

Obdobje opazovanja traja 21 dni.

1.5.3 **Postopek**

Potem ko se živalim da zaščitno sredstvo za preprečevanje smrti zaradi akutnih holinergičnih učinkov, se preskusna snov vnese v enkratnem odmerku.

1.5.3.1 Splošno opazovanje

Opazovanje je treba začeti takoj po izpostavitvi. Vse kokoši je treba večkrat na dan natančno opazovati prva 2 dni preskusa in nato najmanj enkrat na dan v obdobju 21 dni ali do njihove predvidene usmrtitve. Zabeležiti je treba vse znake toksičnosti, vključno s časom nastopa, vrsto, resnostjo in trajanjem vedenjskih nepravilnosti. Za ataksijo je treba uporabiti stopenjsko ocenjevalno lestvico, sestavljeno iz najmanj štirih stopenj, zabeležiti pa je treba tudi primere paralize. Najmanj dvakrat na teden je treba kokoši, ki so bile izbrane za patološka opazovanja, izpustiti iz kletk in jih pripraviti k prisilni motorični dejavnosti, kakršno je denimo plezanje po lestvi, da bi bilo olajšano opazovanje minimalnih toksičnih učinkov. Umirajoče živali ali živali, ki kažejo znake hudega trpljenja in hude bolečine, je treba odstraniti, humano usmrtiti in opraviti nekropsijo.

▼B

1.5.3.2 Telesna teža

Vse živali je treba stehtati neposredno pred dajanjem preskusne snovi in nato najmanj enkrat na teden.

1.5.3.3 Biokemija

V nekaj dneh po vnosu odmerka je treba usmrtiti šest naključno izbranih kokoši iz vsake tretirane skupine in kontrolne skupine, ki ji je vnesen zgolj nosilec, ter tri kokoši iz pozitivne kontrolne skupine (če je ta skupina preskušena hkrati), možgane in ledveno hrbtenjačo pa je treba pripraviti in analizirati za določitev morebitne inhibicije nevropatske ciljne erastaze. Poleg tega je lahko za določitev inhibicije nevropatske ciljne erastaze koristno pripraviti in analizirati ishiatično živčno tkivo. Običajno se usmrtijo po tri ptice iz kontrolne skupine in vsake tretirane skupine po 24 urah in tri po 48 urah, medtem ko se tri kokoši iz pozitivnih kontrolnih skupin usmrtijo po 24 urah. Če opazovanja kliničnih znakov intoksikacije (ki se lahko oceni z opazovanjem časa nastopa holinergičnih znakov) kažejo, da bo odstranitev toksičnega sredstva potekala zelo počasi, utegne biti primernejše, da se odvzame tkivo pri treh pticah v obeh terminih v obdobju od 24 ur in do najpozneje 72 ur po vnosu odmerka.

Na teh vzorcih se po potrebi lahko opravijo analize acetilholinesteraze (AChE). Vendar se *in vivo* lahko AchE spontano reaktivira, kar lahko vodi k podcenjevanju zmožnosti neke snovi kot inhibitorja AChE.

1.5.3.4 Makroskopska nekropsija

Makroskopska nekropsija vseh živali (usmrčenih po načrtu in ubitih zaradi umiranja) naj vključuje opazovanje videza možganov in hrbtenjače.

1.5.3.5 Histopatološka preiskava

Živčno tkivo živali, preživelih obdobje opazovanja, in ki ni bilo uporabljeno za biokemične študije, se uporabi za mikroskopske preiskave. Tkivo je treba fiksirati *in situ* z uporabo tehnik škropitve. Opravi se odvzem tkiva na malih možganih (srednja longitudinalna stopnja), podaljšani hrbtenjači, hrbtenjači in perifernem živčevju. Vzorce hrbtenjače je treba odvzeti z zgornjega vratnega predela, srednjega prsnega in ledveno-križnega predela. Odvzamejo se tudi vzorci distalnega dela tibialnega živca in njegovih vej v smeri dvoglave mečne mišice in shiatičnega živca. Vzorce tkiva je treba obarvati z ustreznimi mielinskimi in specifičnimi aksonskimi barvili.

2. **PODATKI**

Če so rezultati na končnih točkah, izbranih v tej metodi (biokemija, histopatologija in opazovanje obnašanja), negativni, dodatno preskušanje zapoznele nevrotoksičnosti navadno ni potrebno. Dvoumni in nedokončni rezultati za te končne točke lahko zahtevajo dodatno ocenjevanje.

Priskrbeti je treba podatke za vsako posamezno žival. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki tabele, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, ki kažejo poškodbe, vedenjske spremembe in biokemične učinke, vrste in resnost teh poškodb ali učinkov in odstotek živali, ki jih je prizadela posamezna vrsta in resnost poškodbe ali učinka.

▼B

Izsledke te študije je treba ocenjevati glede na pojav, resnost in korelacije vedenjskih, biokemičnih in histopatoloških učinkov ter katerih koli drugih opaženih učinkov v tretiranih in kontrolnih skupinah.

Številčne rezultate je treba ocenjevati na podlagi primernih in splošno priznanih statističnih metod. Uporabljene statistične metode je treba izbrati pri izdelavi študije.

3. **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, poročilo o preskusu vključuje naslednje informacije:

Poskusne živali:

— uporabljen sev,

— število in starost živali,

— izvor, nastanitveni pogoji, itd.,

— teža vsake živali na začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— podrobni podatki o pripravi preskusne snovi, stabilnosti in homogenosti, kjer je primerno,

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca,

— podrobni podatki o dajanju preskusne snovi,

— podrobni podatki o kvaliteti hrane in vode,

— utemeljitev izbire odmerka,

— opis danih odmerkov, vključno s podrobnimi podatki o nosilcu in volumnu ter fizikalni obliki dane snovi,

— vrsta zaščitnega sredstva in podrobni podatki o njegovem vnosu.

Rezultati:

— podatki o telesni teži,

— podatki o toksičnem odzivu glede na skupino, vključno s smrtnostjo,

— narava, resnost in trajanje kliničnih opazovanj (reverzibilnih ali nereverzibilnih),

— natančen opis biokemičnih metod in njihovih izsledkov,

— izsledki nekropsije,

— podroben opis vseh histopatoloških izsledkov,

— statistična obdelava rezultatov, kjer je primerno.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

4. **SKLICEVANJA**

Ta metoda je skladna s smernicami za preskušanje OECD TG 418.

▼B

B.38 **ZAPOZNELA NEVROTOKSIČNOST ORGANOFOSFORNIH SNOVI – 28-DNEVNA ŠTUDIJA S PONAVLJAJOČIMI SE ODMERKI**

1. **METODA**

1.1 UVOD

Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih učinkov snovi je pomembno upoštevati potencial določenih razredov snovi, da povzročijo posebne vrste nevrotoksičnosti, ki se morda ne odkrijejo v drugih študijah toksičnosti. Nekatere organofosforne snovi, za katere je bilo opaženo, da povzročajo zapoznelo nevrotoksičnost, bi morale biti predmet takšnega ocenjevanja.

Izločilne študije *in vitro* bi se lahko uporabile za določanje tistih snovi, ki lahko povzročijo zapoznelo polinevropatijo; vendar negativni izsledki študij *in vitro* ne zagotavljajo dokazov, da preskusna snov ni nevrotoksikant.

Ta 28-dnevni preskus zapoznele nevrotoksičnosti daje informacije o morebitnih nevarnostih za zdravje, ki jih lahko povzroči ponovna izpostavljenost v določenem obdobju. Prav tako bo zagotovil informacije o odzivu na odmerke in omogočil oceno stopnje koncentracije brez opaznih negativnih vplivov (NOAEL), ki se lahko uporablja za določitev meril o varnosti za izpostavljenost.

Glej del B splošnega uvoda.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Organofosforne snovi vključujejo nenabite organofosforne estre, tioestre ali anhidride organofosfornih, organofosfoničnih ali organofosforamidnih kislin ali sorodnih fosforotiotskih, fosfonotiotskih ali fosforotioamidskih kislin ali druge snovi, ki lahko povzročijo zapoznelo nevrotoksičnost, ki se včasih zasledi v tem razredu snovi.

Zapoznela nevrotoksičnost je sindrom, povezan z dolgotrajnim zapoznelim nastopom ataksije, distalnimi aksonopatijami hrbtenjače in perifernega živčevja ter z inhibicijo in staranjem nevropatske ciljne esteraze (NTE) v živčnem tkivu.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Dnevni odmerki preskusne snovi se domačim kokošim dajejo oralno 28 dni. Živali je treba najmanj enkrat na dan opazovati zaradi morebitnih vedenjskih nepravilnosti, ataksije in paralize do štirinajstega dneva po vnosu zadnjega odmerka. Navadno se od 24 do 48 ur po vnosu zadnjega odmerka opravijo biokemične analize, zlasti inhibicije nevropatske ciljne esteraze (NTE), na naključno izbranih kokoših iz vsake skupine. Dva tedna po vnosu zadnjega odmerka se usmrtijo druge kokoši in izvede se histopatološka preiskava izbranega živčnega tkiva.

▼B

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Priprave**

Zdrave, mlade, odrasle kokoši, ki ne kažejo znakov virusnih obolenj, niso tretirane s snovmi, ki bi vplivala na rezultat preskusa, in ki ne kažejo znakov nenavadnega obnašanja, je treba naključno razvrstiti v skupino, ki bo tretirana, in kontrolno skupino ter jih aklimatizirati na laboratorijske razmere najmanj 5 dni pred začetkom študije.

Uporabiti je treba kletke ali ograde, ki so dovolj velike, da omogočajo prosto gibanje kokoši in olajšajo opazovanje obnašanja živali.

Običajno je treba odmerek dajati oralno vsak dan in sedem dni na teden, po možnosti z gastrično sondo ali želatinastimi kapsulami. Tekočine se lahko vnašajo nerazredčene ali raztopljene v ustreznem nosilcu, kakršno je na primer koruzno olje; če je mogoče, je treba trdne snovi raztopiti, ker se utegne zgoditi, da se veliki odmerki v želatinastih kapsulah ne absorbirajo učinkovito. Pri nevodnih nosilcih je treba poznati njihove toksične značilnosti ali jih v nasprotnem določiti pred začetkom preskusa.

1.4.2 **Preskusni pogoji**

1.4.2.1 *Poskusne živali*

Priporoča se uporaba mladih odraslih domačih kokoši nesnic (Gallus gallus domesticus), ki so stare od 8 do 12 mesecev. Uporabiti je treba kokoši pasem standardne velikosti in sevov, običajno vzrejene v okoliščinah, ki kokošim dovoljujejo svobodno gibanje.

1.4.2.2 *Število in spol*

Običajno je treba uporabiti najmanj tri skupine za tretiranje in eno kontrolno skupino. Slednjo skupino je treba tretirati enako kakor skupino za tretiranje, razen da se živalim ne da preskusna snov.

Vsaka skupina ptic naj bo sestavljena iz zadosti kokoši, da se lahko najmanj šest ptic usmrti za biokemične analize (tri na vsakega od obeh časovnih terminov opazovanja) in da lahko šest ptic preživi 14-dnevno obdobje opazovanja za patološke preiskave.

1.4.2.3 *Velikost odmerkov*

Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati tri rezultate preskusa zapoznele nevrotoksičnosti po akutni izpostavljenosti in vse druge obstoječe podatke o toksičnosti ali toksikokinetiki za preskusno zmes. Izbrati je treba največji odmerek, ki bi povzročil toksične učinke, po možnosti zapoznelo nevrotoksičnost, ne pa smrti ali hudega trpljenja. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se dokažeta vsak odziv, ki je pogojen z odmerkom, in koncentracija brez opaznih negativnih vplivov pri najmanjšem odmerku.

▼B

1.4.2.4 *Mejni preskus*

Če preskus z velikostjo odmerka, ki znaša najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, z uporabo predpisanih postopkov za to študijo ne povzroči nobenih opaznih toksičnih učinkov in če podatki o strukturno sorodnih snoveh ne kažejo na pojav toksičnosti, študije z uporabo višjega odmerka ni treba izvesti. Mejni preskus se ne uporabi samo, če izpostavljenost človeka kaže na potrebo po uporabi večjega odmerka.

1.4.2.5 *Obdobje opazovanja*

Vse živali je treba med obdobjem izpostavljenosti in 14 dni po njem opazovati najmanj enkrat na dan, razen če je bila predvidena nekropsija.

1.4.3 **Postopek**

Živalim se dajejo odmerki preskusne snovi sedem dni na teden v obdobju 28 dni.

1.4.3.1 *Splošna opazovanja*

Opazovanja je treba začeti, takoj ko se lotimo tretiranja. Vse kokoši je treba najmanj enkrat na dan natančno opazovati vseh 28 dni tretiranja in naslednjih 14 dni ali do predvidene usmrtitve. Zabeležiti je treba vse znake toksičnosti, vključno s časom nastopa, vrsto, resnostjo in trajanjem. Opazovanja naj med drugim vključujejo vedenjske nepravilnosti. Ataksijo je treba meriti z vrstilno ocenjevalno lestvico, sestavljeno iz najmanj štirih stopenj, zabeležiti pa je treba tudi primere paralize. Najmanj dvakrat na teden je treba kokoši izpustiti iz kletk in jih pripraviti k prisilni motorični dejavnosti, kakršno je denimo plezanje po lestvi, da bi bilo olajšano opazovanje minimalnih toksičnih učinkov. Umirajoče živali ali živali, ki kažejo znake hudega trpljenja ali hude bolečine, je treba odstraniti, humano usmrtiti in opraviti nekropsijo.

1.4.3.2 *Telesna teža*

Vse kokoši je treba neposredno pred prvim dajanjem preskusne snovi in nato najmanj enkrat na teden stehtati.

1.4.3.3 *Biokemija*

V nekaj dneh po vnosu zadnjega odmerka je treba usmrtiti šest naključno izbranih kokoši iz tretirane in iz kontrolne skupine, možgane in ledveno hrbtenjačo pa je treba pripraviti in analizirati za določitev morebitne inhibicije nevropatske ciljne esteraze (NTE). Poleg tega je za določitev inhibicije nevropatske ciljne esteraze lahko koristno pripraviti in analizirati ishiatično živčno tkivo. Navadno se po 24 urah usmrtijo po tri ptice iz kontrolne in iz vsake tretirane skupine ter tri živali 48 ur po vnosu zadnjega odmerka. Če podatki iz študije akutne izpostavljenosti ali drugih študij (npr. toksikokinetika) kažejo, da je bolj priporočljiv drug čas usmrtitve po zadnjem vnosu odmerka, je treba uporabiti ta čas in razloge za tako ravnanje utemeljiti.

Na teh vzorcih se po potrebi lahko izvedejo analize acetilholinesteraze (AChE). Vendar se AChE *in vivo* lahko spontano reaktivira, kar lahko vodi k podcenjevanju učinkovitosti neke snovi kot inhibitorja AChE.

▼B

1.4.3.4 *Makroskopska nekropsija*

Makroskopska nekropsija vseh živali (tistih, ki so usmrčene po programu, in tistih, ki so usmrčene, ko že umirajo) naj vključuje opazovanje videza možganov in hrbtenjače.

1.4.3.5 *Histopatološka preiskava*

Živčno tkivo živali, preživelih obdobje opazovanja, ki ni bilo uporabljeno za biokemijske študije, je treba uporabiti za mikroskopske preiskave. Tkivo je treba fiksirati *in situ* z uporabo tehnik škropitve. Odvzem tkiva se opravi na malih možganih (srednja longitudinalna stopnja), podaljšani hrbtenjači, hrbtenjači in perifernem živčevju. Vzorce hrbtenjače je treba odvzeti z zgornjega vratnega predela, srednjega prsnega in ledveno-križnega predela. Odvzamejo se tudi vzorci distalnega dela tibialnega živca in njegovih vej v smeri dvoglave mečne mišice ter ishiatičnega živca. Vzorce tkiva je treba obarvati z ustreznimi mielinskimi in aksonskimi barvili. Mikroskopsko preiskavo je na začetku treba opraviti na shranjenem tkivu vseh živali kontrolne skupine in skupine, tretirane z velikim odmerkom. Če v slednji skupini obstajajo dokazi o učinkih, je treba izvesti tudi mikroskopsko preiskavo tkiv kokoši iz skupin s srednjim in nizkim odmerkom.

2. **PODATKI**

Če so rezultati na končnih točkah, izbranih v tej metodi (biokemija, histopatologija in opazovanje obnašanja), negativni, dodatno preskušanje zapoznele nevrotoksičnosti navadno ni potrebno. Dvoumni in nedokončni rezultati za te končne točke lahko zahtevajo nadaljnje ocenjevanje.

Priskrbeti je treba podatke za vsako posamezno žival. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki tabele, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, ki kažejo poškodbe, vedenjske spremembe in biokemične učinke, vrste in resnost teh poškodb ali učinkov ter odstotek živali, ki jih je prizadela posamezna vrsta in resnost poškodbe ali učinka.

Izsledke te študije je treba ocenjevati glede na pojav, resnost in korelacije vedenjskih, biokemičnih in histopatoloških učinkov ter katerih koli drugih opaženih učinkov v vsaki tretirani in kontrolni skupini.

Številčne rezultate je treba ocenjevati na podlagi primernih in splošno priznanih statističnih metod. Uporabljene statistične metode je treba izbrati pri izdelavi študije.

3. **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, poročilo o preskusu vključuje naslednje informacije:

Preskusne živali:

— uporabljeni sev,

— število in starost živali,

— izvor, nastanitvene razmere itd.,

— teža vsake živali na začetku preskusa.

▼B

Preskusni pogoji:

— podrobni podatki o pripravi preskusne snovi, stabilnosti in homogenosti, kjer je primerno,

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca,

— podrobni podatki o dajanju preskusne snovi,

— podrobni podatki o kvaliteti hrane in vode,

— utemeljitev izbire odmerka,

— opis danih odmerkov, vključno s podrobnimi podatki o nosilcu in volumnu ter fizikalni obliki dane snovi,

— če so biokemijske analize izvedene ob drugačnem času, kakršen je bil predviden (24 in 48 ur), utemeljitev takšne izbire.

Rezultati:

— podatki o telesni teži,

— podatki o toksičnem odzivu glede na velikost odmerka, vključno s smrtnostjo,

— stopnja koncentracije brez opaznih negativnih vplivov,

— narava, resnost in trajanje kliničnih opazovanj (reverzibilnih ali nereverzibilnih),

— natančen opis biokemičnih metod in njihovih izsledkov,

— izsledki nekropsije,

— podroben opis vseh histopatoloških izsledkov,

— statistična obdelava rezultatov, kjer je primerno.

Razprava o rezultatih.

Zaključki.

4. **SKLICEVANJE**

Ta metoda je skladna s smernicami za preskušanje OECD TG 419.

▼B

B.39 PREIZKUS NENAČRTNE SINTEZE DNA (UDS) V JETRNIH CELICAH SESALCEV *IN VIVO*

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 UVOD

Namen preizkusa nenačrtne sinteze DNA (UDS) v jetrnih celicah sesalcev *in vivo* je določiti preizkušane snovi, ki sprožijo popravljanje DNA v jetrnih celicah tretiranih živali (1), (2), (3), (4).

Ta preizkus *in vivo* je metoda za preiskovanje genotoksičnih učinkov kemikalij na jetra. Izmerjena končna točka kaže na poškodbe in posledično popravljanje DNA v jetrnih celicah. Jetra so navadno glavno področje presnove absorbiranih spojin. Zato so primerno mesto za merjenje poškodb DNA *in vivo*.

Če obstajajo dokazi, da preizkušana snov ne bo dosegla tarčnega tkiva, ta preizkus ni primeren.

Končna točka preizkusa nenačrtne sinteze DNA (UDS) se meri z določanjem sprejema označenih nukleozidov v celicah, v katerih ne poteka načrtna (faza S) sinteza DNA. Najpogosteje uporabljena tehnika je avtoradiografsko določanje sprejema timidina, označenega s tritijem (^{3}H-TdR). Za preizkuse UDS *in vivo* se po možnosti uporabljajo jetra podgan. Namesto jeter se lahko uporabijo druga tkiva, vendar ta niso predmet te metode.

Zaznavanje odziva UDS je odvisno od števila baz DNA, ki se izrežejo in zamenjajo na mestu poškodbe. Zato je preizkus UDS posebej koristen za zaznavanje „popravljanja dolgih delov“ (20 do 30 baz), ki ga povzroči snov. „Popravljanje kratkih delov“ (ena do tri baze) se zazna z mnogo manjšo občutljivostjo. Poleg tega mutageni pojavi lahko nastanejo zaradi nepopravljanja, napačnega popravljanja ali napačnega podvojevanja lezij DNA. Velikost odziva UDS ne da nobenih podatkov o točnosti popravljanja. Možno je tudi, da mutagen reagira z DNA, a se poškodbe DNA ne popravijo s popravljanjem z izrezovanjem. Pomanjkanje specifičnih informacij o mutagenem delovanju pri preizkusu UDS se nadomesti s potencialno občutljivostjo te končne točke, ker se meri v celotnem genomu.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Celice v popravljanju: neto število jedrnih zrnc (NNG), večje od vnaprej določene vrednosti, utemeljene v laboratoriju, ki opravlja preizkus.

Neto število jedrnih zrnc (NNG): kvantitativno merilo za UDS aktivnost v celici pri avtoradiografskih preizkusih UDS, ki se izračuna tako, da se povprečno število citoplazemskih zrnc v jedru enakovrednih območjih citoplazme (CG) odšteje od števila jedrnih zrnc (NG): NNG = NG – CG. Število NNG se izračuna za posamezne celice in nato združi za celice v kulturi, v vzporednih kulturah itn.

▼B

Nenačrtna sinteza DNA (UDS): popravljalna sinteza DNA po izrezu in odstranitvi dela DNA, na katerem je poškodba, ki jo povzročijo kemične snovi ali fizikalni dejavniki.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preizkus UDS v jetrnih celicah sesalcev *in vivo* kaže na popravljalno sintezo DNA po izrezu in odstranitvi dela DNA, na katerem je poškodba, ki jo povzročijo kemične snovi ali fizikalni dejavniki. Preizkus navadno temelji na vključitvi ^{3}H-TdR v DNA jetrnih celic, v katerih je majhna pogostnost celic v fazi S celičnega ciklusa. Sprejem ^{3}H-TdR se navadno določi z avtoradiografijo, ker ta tehnika ni tako dovzetna za motnje, ki jih povzročajo celice v fazi S, kakor je to na primer metoda tekočinske scintilacije.

1.4 OPIS METODE

1.4.1 **Priprave**

1.4.1.1 *Izbira živalskih vrst*

Navadno se uporabljajo podgane, lahko pa se uporabi katera koli primerna vrsta sesalcev. Uporabijo naj se splošno uporabljani laboratorijski sevi mladih zdravih odraslih živali. Ob začetku študije naj bo nihanje teže živali čim manjše in naj ne presega ± 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

1.4.1.2 *Pogoji bivanja in hranjenja*

Uporabljajo se splošni pogoji iz splošnega uvoda dela B, vendar naj bo ciljna vlažnost 50 do 60 %.

1.4.1.3 *Priprava živali*

Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Kletke se razporedijo tako, da se čimbolj zmanjšajo možni učinki postavitve kletke. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in se pustijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se aklimatizirajo na laboratorijske razmere.

1.4.1.4 *Preizkušana snov/priprava*

Trdne preizkušane snovi naj se pred odmerjanjem živalim raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 **Preizkusni pogoji**

1.4.2.1 *Topilo/nosilec*

Topilo/nosilec naj nima toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in naj se zanj ne sumi, da kemično reagira s preizkušano snovjo. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadar koli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca.

▼B

1.4.2.2 *Kontrolni vzorci*

V vsak samostojno izveden del preizkusa naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo/nosilec) kontrolni vzorci. Razen tretiranja s preizkušano snovjo naj se z živalmi v kontrolni skupini ravna enako kakor s tistimi v tretiranih skupinah.

Snovi pozitivne kontrole naj bodo snovi, za katere se ve, da povzročijo UDS, če se dajejo pri ravneh izpostavljenosti, pri katerih se pričakuje zaznavno povečanje glede na ozadje. Snovi pozitivne kontrole, pri katerih je potrebna aktivacija presnove, naj se uporabljajo v odmerkih, ki povzročijo zmeren odziv (4). Odmerki naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov. Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Čas vzorčenja	Snov	Št. CAS	Št. Einecs
Zgodnja vzorčenja (2 do 4 ure)	N-dimetilnitrozamin	62-75-9	200-249-8
Pozna vzorčenja (12 do 16 ur)	N-2-fluorenilacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Lahko se uporabijo druge ustrezne snovi pozitivne kontrole. Sprejemljivo je, da se snovi pozitivne kontrole dajejo živalim drugače kakor preizkušana snov.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 **Število in spol živali**

Uporabi naj se zadostno število živali, da se upošteva naravno biološko nihanje odziva na preizkus. V vsaki skupini naj bodo vsaj tri živali, ki jih je mogoče analizirati. Če že obstaja obsežna baza preteklih podatkov, sta za sočasne negativne in pozitivne kontrolne skupine potrebni le ena ali dve živali.

Če so v času študije na voljo podatki študij o isti vrsti in ob uporabi istega načina izpostavljanja, ki dokazujejo, da med spoloma ni znatnih razlik v toksičnosti, bo zadostovalo preizkušanje na enem spolu, po možnosti na samcih. Kadar bi bila lahko izpostavljenost kemikaliji pri človeku omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih učinkovinah, naj se preizkus opravi na živalih ustreznega spola.

1.5.2 **Program tretiranja**

Preizkušane snovi se navadno dajejo z enkratnim vnosom.

1.5.3 **Velikost odmerkov**

Navadno se uporabljata vsaj dve velikosti odmerkov. Največji odmerek je odmerek, ki povzroči takšne znake toksičnosti, da se pričakuje, da bi večji odmerki pri istem režimu odmerjanja povzročili smrt. V splošnem naj bo manjši odmerek 50 do 25 % večjega odmerka.

▼B

Snovi s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih netoksičnih odmerkih (na primer hormoni in mitogeni) so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerka in naj se ovrednotijo za vsak primer posebej. Če se opravi študija za ugotavljanje območja, ker ni na voljo ustreznih podatkov, naj se opravi v istem laboratoriju, na isti vrsti, sevu in spolu ter ob enakem režimu tretiranja, kakor bo to uporabljeno v glavni študiji.

Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v jetrih (npr. piknotična jedra).

1.5.4 **Mejni preizkus**

Če preizkus pri eni velikosti odmerka vsaj 2 000 mg/kg telesne teže, ki se da v enem vnosu ali v dveh vnosih v istem dnevu, ne povzroči nobenih opaznih toksičnih učinkov in če se na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh ne pričakuje, da bo snov genotoksična, popolna študija morda ne bo potrebna. Pričakovana izpostavljenost človeka lahko nakaže potrebo po večjih odmerkih pri mejnem preizkusu.

1.5.5 **Dajanje odmerkov**

Navadno se preizkušana snov da z gavažo po želodčni cevki ali ustrezni intubacijski kanili. Sprejemljivi so tudi drugi načini izpostavljanja, kadar se lahko utemeljijo. Vendar intraperitonealni način ni priporočljiv, ker jetra lahko izpostavi preizkušam snovi neposredno in ne prek krvožilnega sistema. Največji volumen tekočine, ki se lahko naenkrat da z gavažo ali injekcijo, je odvisen od velikosti preizkusne živali. Volumen naj ne presega 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih volumnov je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih snoveh, ki bodo navadno povzročile dražilne učinke pri večjih koncentracijah, naj se s prilagoditvijo koncentracije čimbolj zmanjša spremenljivost preizkusnega volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

1.5.6 **Priprava jetrnih celic**

Jetrne celice tretiranih živali se navadno pripravijo 12 do 16 ur po odmerjanju. Navadno je potrebno dodatno, zgodnejše vzorčenje (ponavadi dve do štiri ure po tretiranju), razen če se po 12 do 16 urah pokaže jasen pozitivni odziv. Lahko se vzorči tudi ob drugih časih, kadar je to utemeljeno s podatki o toksikokinetiki.

Navadno se pripravijo kratkotrajne kulture jetrnih celic sesalcev, tako da se jetra perfundirajo *in situ* s kolagenazo in se sveže odcepljenim jetrnim celicam omogoči, da se pritrdijo na ustrezno podlago. Jetrne celice živali negativne kontrole naj imajo sposobnost preživetja (5) vsaj 50 %.

1.5.7 **Določanje UDS**

Sveže izolirane sesalske jetrne celice se primerno dolgo, na primer tri do osem ur, inkubirajo, navadno v gojišču, ki vsebuje ^{3}H-TdR. Po končani inkubaciji se gojišče odstrani s celic, ki se nato lahko inkubirajo v gojišču s presežkom neoznačenega timidina, da se zmanjša nevgrajena radioaktivnost (cold chase). Celice se nato sperejo, fiksirajo in posušijo. Pri daljši inkubaciji „cold chase“ morda ne bo potreben. Mikroskopski preparati se pomočijo v avtoradiografsko emulzijo, se izpostavijo v temi (npr. hranijo se v hladilniku 7 do 14 dni), se razvijejo in pobarvajo, nato se preštejejo izpostavljena srebrna zrnca. Za vsako žival se pripravijo dva do trije preparati.

▼B

1.5.8 **Analiza**

Mikroskopski preparati naj vsebujejo dovolj celic z normalno morfologijo, da je omogočeno smiselno ocenjevanje UDS. Preparati se mikroskopsko pregledajo, da se poiščejo znaki očitne citotoksičnosti (npr. piknoza, zmanjšana raven radioaktivnih označevalcev).

Mikroskopski preparati naj se kodirajo pred štetjem zrnc. Navadno se v štetje vključi 100 celic za vsako žival z vsaj dveh preparatov; štetje manj kakor 100 celic/žival naj bo utemeljeno. Število zrnc se ne določa za jedra v fazi S, lahko pa se evidentira delež celic v fazi S.

Količina ^{3}H-TdR, vgrajenega v jedra in citoplazmo morfološko normalnih celic, kar dokazuje nalaganje srebrnih zrnc, naj se določi z ustreznimi metodami.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Navedejo se podatki za posamezne mikroskopske preparate in živali. Poleg tega naj bodo vsi podatki povzeti v tabeli. Izračuna naj se neto število jedrnih zrnc (NNG) za vsako celico, vsako žival ter vsak odmerek in čas, tako da se od števila NG odšteje število CG. Če se preštevajo „celice v popravljanju“, naj bodo merila za določanje „celic v popravljanju“ utemeljena in zasnovana na podatkih pretekle ali sočasne negativne kontrole. Numerični rezultati se lahko ovrednotijo s statističnimi metodami. Če se uporabijo statistični testi, naj se izberejo in utemeljijo pred začetkom študije.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Primeri meril za pozitivne/negativne odzive vključujejo:

pozitivne	(i)	vrednosti NNG, večje od poprej določenega praga, ki je utemeljen na podlagi preteklih podatkov laboratorija;
ali	(ii)	vrednosti NNG, znatno večje kakor pri sočasni kontroli;
negativne	(i)	vrednosti NNG, v območju preteklega kontrolnega praga ali pod njim;
ali	(ii)	vrednosti NNG, ne znatno večje kakor pri sočasni kontroli.

▼B

Prouči naj se biološka pomembnost rezultatov: to pomeni, naj se upoštevajo parametri, kakor so razlike med živalmi, odvisnost med odmerkom in odzivom ter citotoksičnost. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode. Vendar pa naj statistična značilnost ne bo edini odločilni dejavnik za pozitivni odziv.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvoumni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultat preizkusa UDS z jetrnimi celicami sesalcev *in vivo* pomeni, da preizkušana snov povzroča poškodbe DNA v jetrnih celicah sesalcev *in vivo,* ki se lahko popravijo z nenačrtno sintezo DNA *in vitro.* Negativni rezultat pomeni, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča poškodb DNA, ki se lahko zaznajo s tem preizkusom.

Obravnava naj se verjetnost, da preizkušana snov doseže krvni obtok ali posebej tarčno tkivo (npr. sistemska toksičnost).

3. **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

— utemeljitev izbire nosilca,

— topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev,

— število, starost in spol živali,

— vir, pogoji bivanja, prehrana itn.,

— teža posameznih živali na začetku preizkusa, skupaj z območjem telesne teže, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

— pozitivni in negativni (nosilec/topilo) kontrolni vzorci,

— podatki študije za ugotavljanje območja, če j e bila opravljena,

— razlogi za izbiro velikosti odmerka,

— podrobnosti o pripravi preizkušane snovi,

— podrobnosti o dajanju preizkušane snovi,

— razlogi za način dajanja,

— metode za preverjanje, ali je preizkušana snov dosegla krvni obtok ali tarčno tkivo, če je to primerno,

▼B

— način preračunavanja koncentracije preizkušane snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je to primerno,

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode,

— podroben opis programov tretiranja in vzorčenja,

— metode merjenja toksičnosti,

— metoda priprave in kultiviranja jetrnih celic,

— uporabljena avtoradiografska tehnika,

— število pripravljenih mikroskopskih preparatov in število celic, upoštevanih pri štetju,

— merila vrednotenja,

— merila za določitev, ali je študija pozitivna, negativna ali dvoumna,

Rezultati:

— srednja vrednost števila jedrnih zrnc, števila citoplazemskih zrnc in neto števila jedrnih zrnc za posamezne mikroskopske preparate, živali in skupine,

— odvisnost med odmerkom in odzivom, če je na voljo,

— statistična ocena, če je na voljo,

— znaki toksičnosti,

— podatki o sočasni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli,

— podatki o pretekli negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,

— število „celic v popravljanju“, če je bilo določeno,

— število celic v fazi S, če je bilo določeno,

— sposobnost preživetja celic.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. **LITERATURA**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, str. 1–18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, str. 123–133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 52–77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. Mutation Res., 312, str. 263–285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, str. 21–27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, str. 553–562.

▼M8

B.40 **JEDKOST ZA KOŽO *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA TRANSKUTANE ELEKTRIČNE UPORNOSTI (TER)**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 430 (2015). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1])). Pri tej posodobljeni preskusni metodi B.40 se izvede postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi ter zmesi v skladu z GHS ZN (1) in uredbo CLP.

2. Ocena jedkosti za kožo se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (2). Poleg sedanje preskusne metode B.40 so bile validirane še druge preskusne metode *in vitro* za preskušanje potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti za kožo, ki so bile sprejete kot preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) (3) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (4), s katerima se lahko po potrebi opredelijo tudi podkategorije jedkih kemikalij. Več validiranih preskusnih metod *in vitro* je bilo sprejetih kot preskusna metoda B.46 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 439) (5), ki naj bi se uporabljala za preskušanje draženja kože. V Smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani različni viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (6).

3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka jedkost za kožo z vidika zdravja ljudi. Temelji na preskusni metodi transkutane električne upornosti (TER) pri podganah, pri kateri se z uporabo kožnih ploščic opredelijo jedke snovi glede na njihovo zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice. Ustrezna smernica OECD za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2004, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA.

4. Za oceno preskušanja *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo za regulativne namene so bile izvedene predvalidacijske študije (7), ki jim je sledila uradna validacijska študija preskusne metode TER na podganji koži za oceno jedkosti za kožo (8) (9) (10) (11). Na podlagi izidov teh študij je bilo

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

▼M8

izdelano priporočilo, da se lahko preskusna metoda TER (imenovana validirana referenčna metoda – VRM) uporabi za regulativne namene za oceno jedkosti za kožo *in vivo* (12) (13) (14).

5. Preden se omogoči uporaba predlagane podobne ali spremenjene preskusne metode TER *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo, ki ni VRM, za regulativne namene, je treba določiti njeno zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njena podobnost z VRM v skladu s standardi izvajanja (15). Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena preskusna metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v ustrezno smernico OECD za preskušanje.

OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI

7. V validacijski študiji (10) in drugih objavljenih študijah (16) (17) so ugotovili, da se lahko pri preskusni metodi TER na podganji koži razlikuje med znanimi snovmi, ki so jedke za kožo, in znanimi snovmi, ki niso jedke, s splošno 94-odstotno občutljivostjo (51/54) in 71-odstotno specifičnostjo (48/68) za zbirko podatkov o 122 snoveh.

8. S to preskusno metodo se obravnava jedkost za kožo *in vitro*. Omogoča opredelitev nejedkih in jedkih preskusnih kemikalij v skladu z GHS ZN/uredbo CLP. Kot so pokazale validacijske študije (8) (9) (10) (11), je omejitev te preskusne metode ta, da ne omogoča razvrstitve jedkih snovi in zmesi v podkategorije v skladu z GHS ZN/uredbo CLP. Uporaba te preskusne metode bo odvisna od veljavnega regulativnega okvira. Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o dražilnosti za kožo, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 izrecno obravnava učinek dražilnosti za kožo *in vitro* na zdravje (5). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti Smernico OECD v zvezi z IATA (6).

9. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preizkušen širok nabor kemikalij, ki predstavljajo predvsem snovi, v empirično zbirko podatkov validacijske študije pa je vključenih 60 snovi, ki zajemajo najrazličnejše kemijske razrede (8) (9). Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov se preskusna metoda uporablja za najrazličnejše kemijske razrede in agregatna stanja, vključno s tekočimi snovmi, poltrdnimi snovmi, trdnimi snovmi in voski. Ker pa za posamezna agregatna stanja preskusne snovi z ustreznimi referenčnimi podatki niso na voljo, je treba opozoriti, da je bilo med validacijo ocenjeno podobno majhno število voskov in jedkih trdnih snovi. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za posamezno kategorijo snovi, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti. Poleg tega se predpostavlja, da se ta preskusna metoda uporablja za zmesi kot razširitev njene uporabe za snovi. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot jo predlagajo Eskes *et al.*, 2012) (18), ne sme uporabiti za to posamezno kategorijo zmesi. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne

▼M8

rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijskih študijah (8) (9). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo preskusne metode TER, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

NAČELO PRESKUSA

10. Preskusna kemikalija se nanese za največ 24 ur na epidermalne površine kožnih ploščic v preskusnem sistemu z dvema komorama, v katerem kožne ploščice delujejo kot pregrada med komorami. Kožne ploščice se odvzamejo s humano usmrčenih podgan, starih 28–30 dni. Jedke kemikalije se opredelijo glede na zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice, ki se meri kot znižanje TER pod raven praga (16) (glej odstavek 32). Za TER na koži podgan je bil na podlagi obsežnih podatkov za širok obseg snovi izbran prag 5 kΩ, kjer je bila velika večina vrednosti precej nad pragom (pogosto > 10 kΩ) ali precej pod njim (pogosto < 3 kΩ) (16). Na splošno preskusne kemikalije, ki niso jedke za živali, ampak so dražilne ali nedražilne, ne znižujejo TER pod ta prag. Prav tako lahko uporaba drugih kožnih pripravkov ali druge opreme spremeni vrednost praga, kar zahteva dodatne validacije.

11. V preskusni postopek je vključena stopnja vezave barvila za potrjevanje pozitivnih rezultatov preskusa TER, kadar so vrednosti okoli 5 kΩ. V stopnji vezave barvila se ugotovi, ali je povečanje ionske prepustnosti posledica fizičnega uničenja rožene plasti pokožnice. Metoda TER je na podganji koži pokazala, da lahko pri kuncih napove jedkost *in vivo*, določeno s preskusno metodo B.4 (2).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

12. Pred redno uporabo preskusne metode TER na koži podgan, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje tehnične usposobljenosti, priporočenih v preglednici 1. V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (16)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

Preglednica 1

Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti [1]

Snov	Št. CAS	Kemijski razred [2]	GHS ZN/ uredba CLP Kat. na podlagi rezultatov *in vivo* [3]	VRM Kat. na podlagi rezultatov *in vitro*	Agregatno stanje	pH [4]
Jedke snovi *in vivo*						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1A	6 × J	tekoče	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1A	6 × J	tekoče	8,3

▼**M8**

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ([2])	GHS ZN/ uredba CLP Kat. na podlagi rezultatov *in vivo* ([3])	VRM Kat. na podlagi rezultatov *in vitro*	Agregatno stanje	pH ([4])
Jedke snovi *in vivo*						
Žveplova kislina (10-odstotna)	7664-93-9	anorganska kislina	(1A/)1B/1C	5 × J 1 × x NJ	tekoče	1,2
Kalijev hidroksid (10-odstotni vodni)	1310-58-3	anorganska baza	(1A/)1B/1C	6 × J	tekoče	13,2
Oktanojska (kaprilska) kislina	124-07-2	organska kislina	1B/1C	4 × J 2 × NJ	tekoče	3,6
2-terc-butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × J 2 × NJ	tekoče	3,9
Nejedke snovi *in vivo*						
Izostearinska kislina	2724-58-5	organska kislina	NJ	6 × NJ	tekoče	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NJ	6 × NJ	trdno	5,5
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NJ	6 × NJ	tekoče	3,6
4-(metiltio)-benzaldehid	3446-89-7	elektrofil	NJ	6 × NJ	tekoče	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	nevtralna organska snov	NJ	6 × NJ	tekoče	3,9
Tetrakloroetilen	127-18-4	nevtralna organska snov	NJ	6 × NJ	tekoče	4,5

Kratice: aq = vodni; št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); VRM = validirana referenčna metoda; J = jedko; NJ = nejedko.

([1]) Snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so najprej razvrščene na jedke in nejedke, nato po podkategoriji jedkosti in nazadnje po kemijskem razredu, so bile izbrane med snovmi, uporabljenimi pri validacijski študiji ECVAM v zvezi s preskusno metodo TER na koži podgan (8) (9). Če ni navedeno drugače, so se snovi preskusile pri stopnji čistosti, pri kateri so bile kupljene od komercialnega vira (8). Kolikor je bilo mogoče, so bile v izbor vključene snovi, ki: (i) predstavljajo razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; snovi, ki so od blago do močno jedke), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z VRM; (ii) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijski študiji; (iii) kažejo značilnosti delovanja VRM; (iv) imajo dobro opredeljene kemijske strukture; (v) dajejo dokončne rezultate pri referenčni preskusni metodi *in vivo*; (vi) so razpoložljive na trgu in (vii) niso povezane s previsokimi stroški odstranjevanja.

([2]) Kemijski razred, dodeljen po Barrattu *et al.* (8).

([3]) Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za kategorije 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN/uredbi CLP.

([4]) Vrednosti pH so povzete po Fentemu *et al.* (9) in Barrattu *et al.* (8).

▼M8

POSTOPEK

13. Na voljo so standardni delovni postopki za preskusno metodo TER v zvezi z jedkostjo za kožo na koži podgan (19). Preskusne metode TER na koži podgan, zajete s to preskusno metodo, morajo izpolnjevati pogoje, navedene v nadaljevanju.

Živali

14. Uporabiti je treba podgane, ker je bila občutljivost kože podgan za snovi pri tej preskusni metodi predhodno dokazana (12) in so edini vir kože, ki je bil uradno validiran (8) (9). Zagotoviti je treba, da so mešički dlak v dormantni fazi, preden se začne rast odraslih dlak, pri čemer sta zlasti pomembna starost (ob odvzemu kože) in sev podgane.

15. Dlaka na hrbtu in bokih mladih približno 22 dni starih samcev ali samic (Wistar ali podobnega seva podgan) se previdno odstrani z majhnimi škarjami. Nato se živali s pazljivim brisanjem umijejo, ostrižena površina pa se potopi v antibiotično raztopino (ki denimo vsebuje streptomicin, penicilin, kloramfenikol in amfotericin v koncentracijah, ki učinkovito preprečujejo rast bakterij). Živali se z antibiotično raztopino ponovno umijejo tretji ali četrti dan po prvem umivanju, uporabijo pa se v 3 dneh po drugem umivanju, ko rožena plast okreva po odstranitvi dlak.

Priprava kožnih ploščic

16. Živali se humano usmrtijo, ko so stare 28–30 dni; ta starost je ključna. Z vsake posamezne živali se nato odstrani hrbtno-bočna koža, s katere se previdno odlušči vsa odvečna podkožna maščoba. Nato se izrežejo kožne ploščice v premeru približno 20 mm. Koža se lahko shrani pred uporabo ploščic, kadar se dokaže, da so podatki pozitivnih in negativnih kontrol enaki kot pri sveži koži.

17. Vsaka kožna ploščica se namesti čez konec cevi iz PTFE (politetrafluoroetilena), pri čemer se mora površina pokožnice dotikati cevi. Čez konec cevi se tesno namesti gumijast obroč, s katerim se koža pričvrsti, nato se obreže odvečno tkivo. Gumijasti obroč se nato z naravnim vazelinom pazljivo pritesni na konec PTFE-cevi. Cev se z vzmetno sponko namesti v receptorsko komoro, ki vsebuje raztopino $MgSO_4$ (154 mM) (slika 1). Kožne ploščice morajo biti popolnoma potopljene v raztopino $MgSO_4$. Iz kože ene podgane je mogoče pridobiti od 10 do 15 kožnih ploščic. Mere cevi in obroča so prikazane na sliki 2.

18. Na dveh kožnih ploščicah iz kože vsake živali se pred začetkom preskušanja za namene kontrole kakovosti izmeri TER. Preostale ploščice se lahko uporabijo pri preskusni metodi, če je električna upornost obeh ploščic večja od 10 kΩ. Če je upornost manjša od 10 kΩ, je treba preostale ploščice, pripravljene iz iste kože, zavreči.

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

19. Pri vsaki ponovitvi (poskusu) je treba uporabiti istočasne pozitivne in negativne kontrole, da se zagotovi ustreznost izvedbe modela poskusa. Pri vsaki ponovitvi (poskusu) se lahko uporabijo le kožne ploščice ene živali. Predlagana preskusna kemikalija za pozitivno kontrolo je 10-molarna klorovodikova kislina, za negativno kontrolo pa destilirana voda.

▼M8

20. Tekoče preskusne kemikalije (150 µl) se enakomerno nanesejo na površino pokožnice v cevi. Pri preskušanju trdnega materiala se na kožno ploščico enakomerno nanese dovolj trdne snovi, da se zagotovi, da je prekrita celotna površina pokožnice. Nato se na trdno snov doda deionizirana voda (150 µl), cevka pa se rahlo pretrese. Za največji stik s kožo bo morda treba trdno snov segrevati do 30 °C, da se preskusna kemikalija stali ali zmehča, ali zmleti, da nastane granulat ali prašek.

21. Za vsako preskusno in kontrolno kemikalijo se pri vsaki ponovitvi (poskusu) uporabijo tri kožne ploščice. Preskusne kemikalije se za 24 ur nanesejo pri 20–23 °C. Preskusna kemikalija se odstrani tako, da se toliko časa spira s curkom tekoče vode pri največ sobni temperaturi, dokler ni več mogoče odstraniti materiala.

Meritve TER

22. Impedanca kože se izmeri kot TER z Wheatstonovim mostičem nizke napetosti in izmeničnega toka (18). Splošne specifikacije za mostič so: delovna napetost 1–3 volte, izmenični tok 50–1 000 Hz v obliki sinusa ali pravokotnika in merilno območje najmanj 0,1–30 kΩ. Merilni mostič v validacijski študiji je meril induktivnost do 2 000 H, kapacitivnost do 2 000 µF in upornost do 2 MΩ pri frekvencah 100 Hz ali 1 kHz v zaporednih ali vzporednih meritvah. V preskusu jedkosti TER se meritve evidentirajo v obliki upornosti pri frekvenci 100 Hz in z zaporednimi vrednostmi. Pred merjenjem električne upornosti se površinska napetost kože zmanjša, tako da se doda zadostna količina 70-odstotnega etanola, da prekrije pokožnico. Po nekaj sekundah se etanol odstrani iz cevi, tkivo pa se nato navlaži s 3 ml raztopine $MgSO_4$ (154 mM). Za merjenje upornosti v kΩ/kožno ploščico se elektrode merilnega mostiča namestijo na vsako stran kožne ploščice (slika 1). Mere elektrod in dolžina elektrode pod krokodilsko sponko so navedene na sliki 2. Sponka notranje (debele) elektrode med merjenjem upornosti leži na vrhu PTFE-cevi, s čimer se zagotovi, da je v raztopino $MgSO_4$ ves čas potopljena enaka dolžina elektrode. Zunanja elektroda je v receptorski komori, in sicer se dotika njenega dna. Razdalja med vzmetno sponko in dnom PTFE-cevi je konstantna (slika 2), saj ta razdalja vpliva na dobljeno vrednost upornosti. Zato mora biti razdalja med notranjo elektrodo in kožno ploščico konstantna in minimalna (1–2 mm).

23. Če je izmerjeni upor večji od 20 kΩ, je to morda posledica tega, da ostanki preskusne kemikalije prekrivajo površino pokožnice kožne ploščice. Za dodatno odstranitev te plasti se lahko na primer začepi PTFE-cev z orokavičenim palcem in jo stresa približno 10 sekund; raztopina $MgSO_4$ se zavrže, merjenje upornosti pa se ponovi s svežim $MgSO_4$.

24. Lastnosti in mere preskusne naprave in uporabljenega poskusnega postopka lahko vplivajo na pridobljene vrednosti TER. Prag za jedkost 5 kΩ je bil ugotovljen na podlagi podatkov, pridobljenih s posebnimi napravami in postopkom, opisanim v tej metodi. Če se preskusni pogoji bistveno spremenijo ali če se uporabi drugačna naprava, lahko veljajo drugačni pragovi in kontrolne vrednosti. Zaradi tega je treba metodologijo in prag upornosti obvezno umerjati s preskušanjem vrste snovi za preverjanje usposobljenosti, ki se izberejo med snovmi, uporabljenimi v validacijski študiji (8) (9), ali skupinami snovi, ki so podobne preskušani. Nabor primernih snovi za preverjanje usposobljenosti je prikazan v preglednici 1.

▼M8

Metode vezave barvila

25. Izpostavljenost določenim nejedkim materialom lahko povzroči zmanjšanje upornosti pod prag 5 kΩ, pri čemer je omogočen prehod ionov skozi roženo plast in s tem zmanjšanje električne upornosti (9). Npr. nevtralne organske snovi in snovi, ki so površinsko aktivne (med drugim detergenti, emulgatorji in druge površinsko aktivne snovi), lahko odstranjujejo kožne lipide in povzročijo večjo prepustnost za ione. Zato je treba pri vrednostih TER za preskusne kemikalije pod 5 kΩ ali okoli te vrednosti in brez vidnih poškodb kožnih ploščic opraviti oceno penetracije barvila na kontrolnih in tretiranih tkivih, da se ugotovi, ali so vrednosti TER posledica povečane prepustnosti kože ali jedkosti za kožo (7) (9). V slednjem primeru barvilo sulforodamin B pretrga roženo plast, pri čemer barvilo po nanosu na površino kože hitro penetrira in obarva pod njim ležeče tkivo. To specifično barvilo je odporno proti širokemu razponu snovi in nanj ne vpliva ekstrakcijski postopek, opisan spodaj.

Nanos in odstranitev barvila sulforodamin B

26. Po oceni TER se magnezijev sulfat odstrani iz cevi, kožo pa je treba natančno pregledati za vidne poškodbe. Če očitnih večjih poškodb (npr. perforacije) ni, se na površino pokožnice vsake kožne ploščice za 2 uri nanese 150 µl 10-odstotne (m/V) raztopine barvila sulforodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; št. CAS 3520-42-1) v destilirani vodi. Te kožne ploščice se nato približno 10 sekund spirajo s tekočo vodo pri največ sobni temperaturi, da se odstrani morebitno odvečno/nevezano barvilo. Vsaka kožna ploščica se pazljivo odstrani iz PTFE-cevi in prenese v vialo (npr. 20-mililitrsko stekleničko za scintilacijsko tekočino), ki vsebuje deionizirano vodo (8 ml). Viale se 5 minut rahlo stresajo, da se odstrani preostalo odvečno nevezano barvilo. Postopek izpiranja se ponovi, nato pa se kožne ploščice odstranijo in prenesejo v viale, ki vsebujejo 5 ml 30-odstotnega (m/V) natrijevega dodecil sulfata (SDS) v destilirani vodi, ter v inkubatorju čez noč shranijo pri 60 °C.

27. Po inkubaciji se vse kožne ploščice odstranijo in zavržejo, preostala raztopina pa se 8 minut centrifugira pri 21 °C (relativna centrifugalna sila ~ 175 × g). 1 ml vzorca supernatanta se nato razredči v razmerju 1 proti 5 (V/V) (tj. 1 ml + 4 ml) s 30-odstotnim SDS (m/V) v destilirani vodi. Optična gostota raztopine se meri pri 565 nm.

Izračun vsebnosti barvila

28. Vsebnost barvila sulforodamin B v ploščici se izračuna iz vrednosti optične gostote (9) (koeficient molarne ekstinkcije barvila sulforodamin B pri 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekulska masa = 580). Vsebnost barvila se določi za vsako kožno ploščico s pomočjo ustrezne umeritvene krivulje, nato pa se izračuna srednja vrednost vsebnosti barvila za ponovljene vzorce.

Merila za sprejemljivost

29. Povprečni rezultati TER se sprejmejo pod pogojem, da so vrednosti istočasne pozitivne in negativne kontrole v mejah sprejemljivosti za to metodo v preskusnem laboratoriju. Meje sprejemljivosti za metodologijo in naprave, opisane zgoraj, so prikazane v naslednji preglednici.

▼**M8**

Kontrola	Snov	Mejni upor (kΩ)
Pozitivna	10-molarna klorovodikova kislina	0,5–1,0
Negativna	destilirana voda	10–25

30. Povprečni rezultati vezanja barvila se sprejmejo, če so vrednosti istočasne kontrole v mejah sprejemljivosti za metodo. Predlagane sprejemljive meje vsebnosti barvila za kontrolne snovi za zgoraj opisano metodologijo in napravo so navedene v spodnji preglednici.

Kontrola	Snov	Meje vsebnosti barvila (μg/košček)
Pozitivna	10-molarna klorovodikova kislina	40–100
Negativna	destilirana voda	15–35

Razlaga rezultatov

31. Mejna vrednost TER, ki se uporablja za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskusnimi kemikalijami, je bila določena med optimiranjem preskusne metode, preskušena v predvalidacijski fazi in potrjena v uradni validacijski študiji.

32. Napovedni model za preskusno metodo TER v zvezi z jedkostjo za kožo na koži podgan (9) (19), povezan s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, je naveden v nadaljevanju.

Za preskusno kemikalijo se šteje, da ni jedka za kožo:

i) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, večja od (>) 5 kΩ ali

ii) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka (≤) 5 kΩ in

— če na kožnih ploščicah ni vidnih poškodb (npr. perforacije) ter

— je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici manjša (<) od istočasno določene srednje vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole z 10-molarno HCl (za vrednosti pozitivne kontrole glej odstavek 30).

Za preskusno kemikalijo se šteje, da je jedka za kožo:

i) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka (≤) 5 kΩ in so kožne ploščice vidno poškodovane (npr. perforirane) ali

ii) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka (≤) 5 kΩ in

— če na kožnih ploščicah ni vidnih poškodb (npr. perforacije), vendar

▼M8

— je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici večja ali enaka (≥) istočasno določeni srednji vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole z 10-molarno HCl (za vrednosti pozitivne kontrole glej odstavek 30).

33. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno preskušanje (poskus), sestavljeno iz vsaj treh ponovljenih vzorcev kožnih ploščic. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni TER, enak 5 ± 0,5 k Ω, je treba preučiti možnost izvedbe druge neodvisne ponovitve preskušanja (poskusa) in nato še tretje, če so rezultati prvih dveh ponovitev preskušanj (poskusov) neskladni.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Vrednosti upornosti (kΩ), in kadar je primerno, vrednosti vsebnosti barvila (μg/ploščico) za preskusno kemikalijo skupaj s podatki pozitivnih in negativnih kontrol je treba prikazati v obliki preglednice, vključno s podatki za vsak ponovljeni vzorec ploščice pri vsaki ponovitvi preskušanja (poskusa) in srednjimi vrednostmi ± standardni odklon. Vse ponovljene poskuse je treba navesti. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene poškodbe kožnih ploščic.

Poročilo o preskusu

35. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi:

— Snov iz ene sestavine kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— vir, številka serije, če je na voljo;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;

— pogoji skladiščenja.

Preskusne živali:

— uporabljeni sev in spol;

— starost živali, ko so bile uporabljene kot donorke;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— podrobnosti o pripravi kože.

▼**M8**

Preskusni pogoji:

— umeritvene krivulje za preskusne aparature;

— umeritvene krivulje za izvedbo preskusa vezave barvila, filtrirana valovna dolžina, uporabljena za merjenje vrednosti optične gostote, in razpon linearnosti optične gostote merilne naprave (npr. spektrofotometra), če je primerno;

— podrobnosti o preskusnem postopku, uporabljenem za meritve TER;

— podrobnosti o preskusnem postopku, uporabljenem za oceno vezave barvila, če je primerno;

— uporabljeni preskusni odmerki, trajanje obdobij izpostavljenosti in temperature izpostavljenosti;

— podrobnosti o postopku spiranja, uporabljenem po obdobju izpostavljenosti;

— število ponovljenih vzorcev kožnih ploščic, uporabljenih na preskusno kemikalijo, in kontrol (pozitivnih in negativnih kontrol);

— opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;

— navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati:

  i) sprejemljivost vrednosti TER (v k Ω) za pozitivno in negativno kontrolo z navedbo mejnega upora za pozitivne in negativne kontrole;

  ii) sprejemljivost vrednosti vsebnosti barvila (v μg/ploščico) za pozitivno in negativno kontrolo z navedbo mej vsebnosti barvila za pozitivno in negativno kontrolo;

  iii) sprejemljivost rezultatov preskusov z navedbo variabilnosti med ponovljenimi vzorci kožnih ploščic v preteklih preskusih;

— opis uporabljenih meril za odločanje/uporabljenega napovednega modela.

Rezultati:

— preglednice s podatki iz preskusov TER in vezave barvila (če je ustrezno) za posamezne preskusne kemikalije in kontrole, za vsako ponovitev preskušanja (poskusa) in vsak ponovljeni vzorec kožne ploščice (posamezne živali in posamezni vzorci kože), srednje vrednosti, standardni odkloni in koeficienti variacije;

— opis vseh opaženih učinkov;

— izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), druga revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.

(3) Poglavje B.40a te priloge, Model kože *in vitro*.

(4) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.

(5) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., in Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219–255.

(8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., in Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471–482.

(9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483–524.

(10) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., in Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129–147.

(11) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikacija NIH št. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. april 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikacija NIH št. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 218. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼M8

(16) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A., in Rhodes, C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507–512.

(17) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., in Gardner, J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191–194.

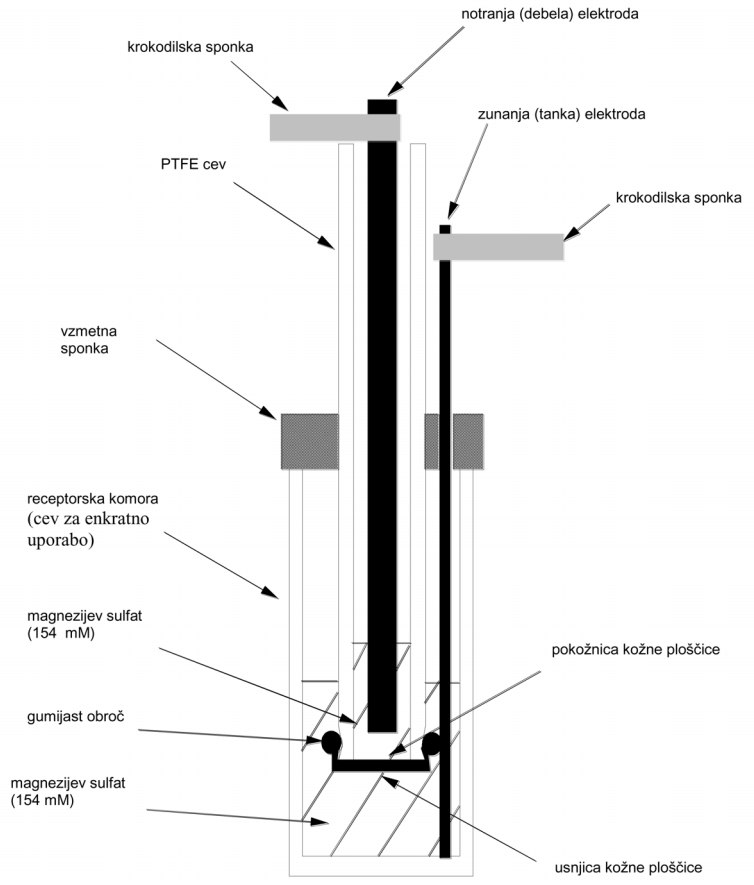
(18) Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L. A., Brüschweiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., D'Abrosca, F., Delveaux, C., Derouette, J. P., Engelking, O., Facchini, D., Fröhlicher, M., Hofmann, M., Hopf, N., Molinari, J., Oberli, A., Ott, M., Peter, R., Sá-Rocha, V. M., Schenk, D., Tomicic, C., Vanparys, P., Verdon, B., Wallenhorst, T., Winkler, G. C., in Depallens, O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (december 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

Slika 1

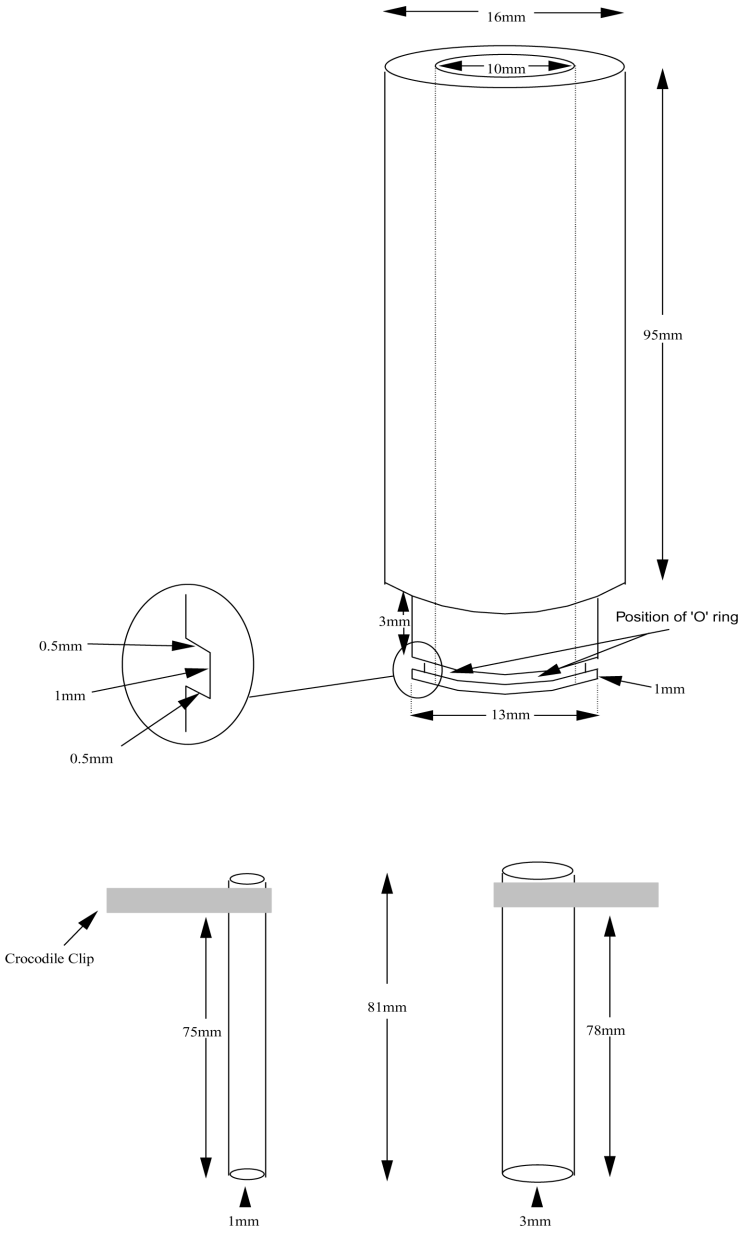
Naprava za preskus ter na koži podgane



▼M8

Slika 2

Mere uporabljenih cevi iz politetrafluoroetilena (PTFE), receptorskih cevi in elektrod



Ključni dejavniki zgoraj prikazane naprave:

— Notranji premer PTFE-cevi,

— dolžina elektrod relativno na PTFE-cev in receptorsko cev, tako da se kožna ploščica ne dotika elektrod in da je v stiku z raztopino $MgSO_4$ standardna dolžina elektrode,

▼**M8**

— višina raztopine $MgSO_4$ v receptorski cevki mora biti relativna na gladino raztopine v PTFE-cevi, kakor je prikazano na sliki 1,

— kožna ploščica mora biti v PTFE-cev dovolj dobro fiksirana, da je električni upor resnično merilo lastnosti kože.

▼**M8**

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (20).

J: jedko.

Kemikalija: snov ali zmes.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušenih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (20).

GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (ZN)): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo $\geq$ 10 mas. % in $<$ 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NJ: nejedko.

OD: optična gostota.

PC: pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

▼M8

Standardi izvajanja (SI): standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij.

Ustreznost: opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (20).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (20).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (20).

Jedkost za kožo *in vivo*: nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (20).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Ponovitev (preskusa): sočasno preskušanje iste preskusne kemikalije na vsaj treh ponovljenih vzorcih kožnih ploščic.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

transkutana električna upornost (TER).: merilo električne impedance kože, ki je izražena kot upornost v kiloohmih. Preprosta in robustna metoda za ocenjevanje pregradne funkcije z evidentiranjem prehoda ionov preko kože z napravo z Wheatstonovim mostičem.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼B

▼M8

B.*40bis* JEDKOST ZA KOŽO *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 431 (2016). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1])). Pri tej posodobljeni preskusni metodi B.40a se izvede postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi in zmesi v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Omogoča tudi delno razvrstitev jedkih snovi v podkategorije.

2. Ocena potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti za kožo se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (2). Poleg sedanje preskusne metode B.40a sta bili validirani še dve drugi preskusni metodi *in vitro* za preskušanje potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti, ki sta bili sprejeti kot preskusna metoda B.40 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 430) (3) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (4). Poleg tega je bila preskusna metoda *in vitro* B.46 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 439) (5) sprejeta za preskušanje potenciala za draženje kože. V smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in povzročanje jedkosti za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (6).

3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka jedkost za kožo z vidika zdravja ljudi. Pri njej se uporablja rekonstruirana človeška pokožnica (pridobljena iz netransformiranih keratinocitov človeške pokožnice), ki ima zelo podobne histološke, morfološke, biokemijske in fiziološke značilnosti kot zgornji deli človeške kože, tj. pokožnica. Ustrezna smernica OECD za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2004, leta 2013 je bila posodobljena zaradi vključitve dodatnih preskusnih metod z uporabo modelov rekonstruirane človeške pokožnice in možnosti uporabe metod za pomoč pri razvrščanju jedkih kemikalij v podkategorije, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in uvedbe uporabe alternativnega postopka za merjenje viabilnosti.

4. V to preskusno metodo so vključeni štirje validirani, na trgu dostopni modeli rekonstruirane človeške pokožnice. Predvalidacijske študije (7), ki jim je sledila uradna validacijska študija za oceno jedkosti za kožo (8) (9) (10), so bile izvedene (11) (12) za dva od teh na trgu dostopnih preskusnih modelov, EpiSkin™ Standard Model (SM) in EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (v nadaljnjem besedilu: validirani referenčni metodi – VRM). Na podlagi rezultatov teh študij je bilo izdano priporočilo, da se lahko obe zgoraj navedeni metodi VRM uporabita za regulativne namene

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

▼M8

za razlikovanje med jedkimi (J) in nejedkimi (NJ) snovmi ter da se lahko model EpiSkin™ poleg tega uporablja kot pomoč pri razvrščanju jedkih snovi v podkategorije (13) (14) (15). Glede na validacijo na podlagi standardov izvajanja sta podobne rezultate kot VRM EpiDerm™ pokazala še dva druga na trgu dostopna modela rekonstruirane človeške pokožnice za preskušanje jedkosti za kožo *in vitro* (16) (17) (18). To sta SkinEthic™ RHE ([1]) in epiCS® (ki se je prej imenoval EST-1000), ki ju je prav tako mogoče uporabiti za regulativne namene za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi snovmi (19) (20). S povalidacijskimi študijami, ki so jih proizvajalci modela rekonstruirane človeške pokožnice izvedli v obdobju 2012–2014 z izpopolnjenim protokolom za odpravo interferenc nespecifične redukcije MTT s preskusnimi kemikalijami, sta se izboljšali uspešnost razlikovanja med jedkimi in nejedkimi snovmi ter pomoč pri razvrščanju jedkih snovi v podkategorije (21) (22). Opravljene so bile dodatne statistične analize povalidacijskih podatkov, pridobljenih z modeli EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in EpiCS®, da bi se opredelili alternativni napovedni modeli, s katerimi se je izboljšala napovedna zmogljivost za razvrstitev v podkategorije (23).

5. Preden se omogoči uporaba predlagane podobne ali spremenjene preskusne metode z rekonstruirano človeško pokožnico *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo, ki ni VRM, za regulativne namene, je treba določiti njeno zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njena podobnost z VRM v skladu s standardi izvajanja (24), navedenimi v skladu z načeli Smernic OECD 34 (25). Medsebojno priznavanje podatkov bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena preskusna metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v ustrezno smernico za preskušanje. Preskusni modeli, vključeni v navedeno smernico za preskušanje, se lahko uporabijo za obravnavanje zahtev držav po rezultatih preskusov v zvezi s preskusno metodo *in vitro* za jedkost za kožo, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov.

OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

7. Ta preskusna metoda omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi ter zmesi v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Ta preskusna metoda dodatno pomaga pri razvrstitvi jedkih snovi in zmesi v neobvezno podkategorijo 1A v skladu z GHS ZN (1) ter kombinacijo podkategorij 1B in 1C (21) (22) (23). Omejitev te preskusne metode je, da ne omogoča razlikovanja med podkategorijo snovi, ki so jedke za kožo, 1B in podkategorijo 1C v skladu z GHS ZN in uredbo CLP zaradi omejenega nabora znanih kemikalij, ki so jedke *in vivo*, iz podkategorije 1C. Preskusne modele EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS® je mogoče razvrstiti v podkategorije (tj. 1A, 1B ali 1C ali NJ).

8. V validacijski študiji v podporo preskusnim modelom, vključenim v to preskusno metodo, ko se uporabljajo za opredelitev nejedkih in jedkih snovi, je bil preskušen širok nabor kemikalij, ki večinoma predstavljajo posamezne snovi; v empirično zbirko podatkov validacijske študije je vključenih 60 kemikalij, ki zajemajo najrazličnejše kemijske razrede (8) (9) (10). Preskušanje za dokaz občutljivosti, specifičnosti in točnosti preskusa ter njegove

([1]) Kratica RhE (= Reconstructed human Epidermis (rekonstruirana človeška pokožnica)) se uporablja za vse modele, ki temeljijo na tehnologiji rekonstruirane človeške pokožnice. Kratica RHE, kot se uporablja v povezavi z modelom SkinEthic™, pomeni isto, vendar je kot del imena te posebne preskusne metode, pod katerim se trži, navedena z velikimi črkami.

▼M8

obnovljivosti v laboratoriju za razvrstitev v podkategorije so izvedli raziskovalci, ki so razvili preskusno metodo, rezultate pa je pregledala OECD (21) (22) (23). Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov se preskusna metoda uporablja za najrazličnejše kemijske razrede in agregatna stanja, vključno s tekočimi snovmi, poltrdnimi snovmi, trdnimi snovmi in voski. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Kadar se lahko dokaže, da preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo, za posamezno kategorijo preskusnih kemikalij ni mogoče uporabiti, se zanjo ne smejo uporabljati. Poleg tega se predpostavlja, da se ta preskusna metoda uporablja za zmesi kot razširitev njene uporabe za snovi. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot je predlagana v (26)), za to posamezno kategorijo zmesi ne sme uporabljati. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijskih študijah (8) (9) (10). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

9. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT, in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (glede na formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti tkiva, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole. Vrsta prilagojenih kontrol, ki so lahko potrebne, je odvisna od vrste interference, ki jo povzroča preskusna kemikalija, in postopka za merjenje formazana MTT (glej odstavke 25–31).

10. Čeprav ta preskusna metoda ne prinaša ustreznih informacij o draženju kože, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 izrecno obravnava učinek draženja kože *in vitro* na zdravje in temelji na istem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, čeprav uporablja drug protokol (5). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti dokument s smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (6). Ta pristop IATA vključuje opravljanje preskusov jedkosti za kožo *in vitro* (kot je opisano v tej preskusni metodi) in preskusov draženja kože pred preskušanjem na živih živalih. Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in pogoji.

NAČELO PRESKUSA

11. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite pokožnice iz človeškega tkiva, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.

▼M8

12. Preskusna metoda z rekonstruirano človeško pokožnico temelji na predpostavki, da lahko jedke kemikalije prodrejo v roženo plast z difuzijo ali erozijo in so citotoksične za spodaj ležeče plasti celic. Viabilnost celic se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid, tiazolil modro tetrazol bromid; številka CAS 298–93-1) v soli modrega formazana, katere količina se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (27). Jedke kemikalije se opredelijo glede na njihovo zmožnost zmanjšanja viabilnosti celic pod opredeljene vrednosti praga (glej odstavka 35 in 36). Preskusna metoda jedkosti za kožo, ki temelji na rekonstruirani človeški pokožnici, je pokazala, da lahko pri kuncih napove učinke jedkosti za kožo *in vivo* v skladu s preskusno metodo B.4 (2).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

13. Pred redno uporabo katerega koli od štirih validiranih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice, ki izpolnjujejo zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. Če se uporabi metoda za razvrščanje v podkategorije, je treba dokazati tudi pravilno razvrščanje v podkategorije. V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (24)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

Preglednica 1

Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti ([1])

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ([2])	Kat. po GHS ZN/uredbi CLP na podlagi rezultatov *in vivo* ([3])	VRM Kat. na podlagi Rezultati*in vitro* ([4])	MTT: MTT ([5])	Agregatno stanje
Podkategorija 1A za jedke snovi *in vivo*						
Bromoocetna kislina	79-08-3	organska kislina	1A	(3) 1A	—	trdno
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	anorganska kislina	1A	(3) 1A	—	tekoče
fenol	108-95-2	fenol	1A	(3) 1A	—	trdno
Dikloroacetil klorid	79-36-7	elektrofil	1A	(3) 1A	—	tekoče
Kombinacija podkategorij 1B in 1C za jedke snovi *in vivo*						
Monohidrat glioksilne kisline	563-96-2	organska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	—	trdno
Mlečna kislina	598-82-3	organska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	—	tekoče
Etanolamin	141-43-5	organska baza	1B	(3) 1B in 1C	da	viskozno

▼**M8**

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ([2])	Kat. po GHS ZN/uredbi CLP na podlagi rezultatov *in vivo* ([3])	VRM Kat. na podlagi Rezultati*in vitro* ([4])	MTT: MTT ([5])	Agregatno stanje
Podkategorija 1A za jedke snovi *in vivo*						
Klorovodikova kislina (14,4 %)	7647-01-0	anorganska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	—	tekoče
Nejedke snovi *in vivo*						
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NJ	(3) NJ	da	tekoče
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NJ	(3) NJ	—	trdno
4-(metiltio)-benzaldehid	3446-89-7	elektrofil	NJ	(3) NJ	da	tekoče
Lavrinska kislina	143-07-7	organska kislina	NJ	(3) NJ	—	trdno

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); VRM = validirana referenčna metoda; NJ = nejedko.

([1]) Snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so najprej razvrščene na jedke in nejedke, nato po podkategoriji jedkosti in nazadnje po kemijskem razredu, so bile izbrane med snovmi, uporabljenimi pri validacijskih študijah ECVAM EpiSkin™ in EpiDerm™ (8) (9) (10), in med povalidacijskimi študijami, temelječimi na podatkih raziskovalcev, ki so razvili EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ in epiCS® (23). Če ni navedeno drugače, so se snovi preskusile pri stopnji čistosti, pri kateri so bile kupljene od komercialnega vira (8) (10). Kolikor je bilo mogoče, so bile v izbor vključene snovi, ki: (i) predstavljajo razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; snovi, ki so od blago do močno jedke), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z VRM; (ii) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijskih študijah; (iii) imajo dobro opredeljene kemijske strukture; (iv) povzročajo obnovljive rezultate v VRM; (v) dajejo dokončne rezultate pri referenčni preskusni metodi *in vivo*; (vi) so razpoložljive na trgu in (vii) niso povezane s previsokimi stroški odstranjevanja.

([2]) Kemijski razred, dodeljen po Barrattu *et al.* (8).

([3]) Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN/uredbi CLP.

([4]) Napovedi VRM *in vitro*, navedene v tej preglednici, so bile dobljene s preskusnima modeloma EpiSkin™ in EpiDerm™ (VRM) med povalidacijskim preskušanjem, ki so ga izvedli razvijalci preskusne metode.

([5]) Vrednosti viabilnosti, dobljene pri validacijskih študijah jedkosti za kožo Evropskega centa za validacijo alternativnih metod (ECVAM), niso bile popravljene za neposredno redukcijo MTT (v validacijskih študijah niso bile izvedene odmrle kontrole). Vendar so bili povalidacijski podatki, ki so jih zagotovili razvijalci preskusne metode in so predstavljeni v tej preglednici, dobljeni s prilagojenimi kontrolami (23).

14. V okviru dokazovanja usposobljenosti se priporoča, da uporabnik po prejetju preveri pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskusna metoda uspešno vzpostavljena in je dokazana usposobljenost glede njene uporabe, redno preverjanje tkiv ni več potrebno. Vendar je priporočljivo, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

POSTOPEK

15. V nadaljevanju so na splošno opisani elementi in postopki preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice za ocenjevanje jedkosti za kožo, zajetih s to preskusno metodo. Modele rekonstruirane človeške pokožnice, potrjene kot znanstveno veljavne za uporabo v okviru te preskusne metode, in sicer modele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE in epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), je mogoče dobiti od komercialnih virov. Za te štiri modele rekonstruirane človeške pokožnice so na voljo standardni delovni postopki (34) (35) (36) (37), njihovi glavni elementi preskusne metode pa so povzeti v Dodatku 2. Priporočljivo je, da se pri izvajanju in uporabi enega od teh modelov v

▼M8

laboratoriju preveri ustrezni standardni delovni postopek. Preskušanje s štirimi preskusnimi modeli rekonstruirane človeške pokožnice, zajetimi s to preskusno metodo, se mora izvajati v skladu z zahtevami, navedenimi v nadaljevanju.

ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

Splošni pogoji

16. Za rekonstrukcijo epitelija se uporabijo netransformirani človeški keratinociti. Pod funkcionalno roženo plastjo je več slojev živih epitelijskih celic (bazalna plast, trnasta plast, zrnata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije primerjalnih kemikalij citotoksičnosti, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri se zaradi primerjalne kemikalije po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC_{50}), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % (ET_{50}) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije (glej odstavek 18). Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečevati prehod materiala okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali gliv.

Pogoji za funkcionalnost

Viabilnost

17. Analiza, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti tkiva, je analiza MTT (27). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruirane človeške pokožnice reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. OD < 0,1. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (OD) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (38). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli mora določiti razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za štiri validirane preskusne modele rekonstruirane človeške pokožnice, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. Evidentirati je treba, da je negativno kontrolno tkivo, kar zadeva celične kulture, v obdobju izpostavljenosti stabilno (meritve optične gostote so podobne).

Preglednica 2

Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za kontrolo kakovosti serije

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Pregradna funkcija

18. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije nekaterih citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. SDS ali Tritona X-100, kot se ocenjuje z IC_{50} ali ET_{50} (preglednica 3). Pregradno funkcijo vsake serije uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice mora dokazati razvijalec/prodajalec zadevnega modela ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 21).

Morfologija

19. Opravljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz večplastne strukture, podobne človeški pokožnici, ki vključuje bazalno plast, trnasto plast, zrnato plast in roženo plast ter ima podoben lipidni profil kot človeška pokožnica. Histološki pregled vsake serije uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice, s katerim se dokaže ustrezna morfologija tkiv, mora zagotoviti razvijalec/prodajalec zadevnega modela ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 21).

Obnovljivost

20. Uporabniki preskusnih metod morajo dokazati obnovljivost preskusnih metod v daljšem časovnem obdobju s pozitivnimi in negativnimi kontrolami. Poleg tega se lahko preskusna metoda uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice zagotovi podatke, ki dokazujejo obnovljivost v daljšem časovnem obdobju z jedkimi in nejedkimi kemikalijami, na primer s seznama snovi za preverjanje usposobljenosti (preglednica 1). Če se preskusna metoda uporabi za razvrščanje v podkategorije, je treba dokazati tudi obnovljivost v zvezi z razvrščanjem v podkategorije.

Kontrola kakovosti

21. Model rekonstruirane človeške pokožnice se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *viabilnost* (odstavek 17), *pregradno funkcijo* (odstavek 18) in *morfologijo* (odstavek 19). Ti podatki se zagotovijo uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Za zanesljivo napoved razvrstitve med jedke snovi se lahko štejejo le rezultati, doseženi s tkivi iz serij, potrjenih s kontrolo kakovosti. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC50 ali ET50 določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za štiri validirane preskusne modele so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3

Merila za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM) (18-urno tretiranje s SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1-odstotni Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 ure	ET50 = 8,7 ure
SkinEthic™ RHE (1-odstotni Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 ure	ET50 = 10,0 ure
epiCS® (1-odstotni Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 ure	ET50 = 7,0 ure

▼M8

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole je treba za vsak čas izpostavljenosti uporabiti vsaj dva ponovljena vzorca tkiva. Za tekoče in trdne kemikalije je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije, da se površina pokožnice enakomerno prekrije, pri čemer mora biti odmerek natančno določen, tj. najmanj 70 µl/cm^2 ali 30 mg/cm^2. Odvisno od modela je treba za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice pred nanosom trdnih kemikalij površino pokožnice navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo (34) (35) (36) (37). Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. Metoda nanosa mora biti primerna glede na preskusno kemikalijo (glej npr. reference (34–37). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo skrbno sprati s pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Odvisno od tega, kateri od štirih validiranih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice se uporabi, se za vsako preskusno kemikalijo uporabita dve ali tri obdobja izpostavljenosti (za vse štiri ustrezne modele rekonstruirane človeške pokožnice: 3 minute in 1 ura; za model EpiSkin™ dodatni čas izpostavljenosti traja 4 ure). Glede na uporabljeni preskusni model rekonstruirane človeške pokožnice in ocenjevano obdobje izpostavljenosti lahko inkubacijska temperatura znaša od sobne temperature do 37 °C.

23. Pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno in pozitivno kontrolo (PC), da se dokaže, da so viabilnost celic (z negativnimi kontrolami), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiva (s PC) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana kemikalija za pozitivno kontrolo je ledocetna kislina ali 8-normalni KOH, odvisno od uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice. Opozoriti je treba, da je 8-normalni KOH snov, ki neposredno zmanjšuje MTT in ki lahko zahteva prilagojene kontrole, kot je opisano v odstavkih 25 in 26. Predlagani negativni kontroli sta 0,9-odstotni NaCl ali voda.

Meritve viabilnosti celic

24. Analizo MTT, ki je kvantitativna analiza, je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti celic (27). Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3 ali 1 mg/ml). S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se izvleče oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi optična gostota pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ ±30 nm, ali z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavka 30 in 31) (38).

25. Preskusne kemikalije lahko vplivajo na analizo MTT ali z neposredno redukcijo MTT v modri formazan in/ali z barvno interferenco, če preskusna kemikalija naravno ali zaradi postopkov tretiranja absorbira v istem razponu optične gostote formazana (570 ± 30 nm, predvsem modre in vijoličaste kemikalije). Dodatne kontrole je treba uporabiti, da se zazna in popravi morebitno vplivanje teh preskusnih kemikalij, kot sta kontrola z nespecifično redukcijo MTT (NSMTT) in kontrola z nespecifično barvo (NSC) (glej odstavke od 26 do 30). To je še zlasti pomembno, če se določena preskusna kemikalija z izpiranjem s tkiva ne odstrani v celoti ali če prodre v pokožnico, tako da je med preskusom viabilnosti MTT prisotna v tkivu. Za podrobnejši opis načina popravka neposredne redukcije MTT in vpliva barvil glej standardne delovne postopke za preskusne modele (34) (35) (36) (37).

▼**M8**

26. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati sveže pripravljenemu mediju MTT (34) (35) (36) (37). Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo, obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilni pokožnici, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar absorbirajo podobno količino preskusne kemikalije kot viabilna tkiva. Vsaka kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva dvojnika odmrlega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato se na teh dvojnikih opravi celoten preskus jedkosti za kožo. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSMTT).

27. Za opredelitev morebitnega vplivanja obarvanih preskusnih kemikalij ali preskusnih kemikalij, ki so se obarvale v stiku z vodo ali izopropanolom, in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, je treba opraviti spektralno analizo preskusne kemikalije v vodi (okolje med izpostavljenostjo) in/ali izopropanolu (raztopina za ekstrahiranje). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira svetlobo v razponu 570 ± 30 nm, je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 30 in 31). Pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD) se vsaka moteča obarvana preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato se na teh ponovljenih vzorcih izvede celoten preskus jedkosti za kožo, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z medijem namesto z raztopino MTT, da se ustvari kontrola z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$). Kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$) je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv izvesti sočasno za vsak čas izpostavljenosti za vsako obarvano preskusno kemikalijo (pri vsaki ponovitvi). Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, pri čemer se ta preskus izvede sočasno s preskusom, ki se popravlja (% $NSC_{živo}$).

28. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 26) in povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 27), je potreben tudi tretji niz kontrol poleg NSMTT in $NSC_{živo}$, opisanih v prejšnjih odstavkih, ko se izvaja meritev standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki motijo analizo MTT (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira oceno njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 26. Te preskusne kemikalije se lahko vežejo na živa in odmrla tkiva, zato se s kontrolo NSMTT ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi vezave preskusne kemikalije na odmrla tkiva. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo $NSC_{živo}$ že popravi barvna interferenca, ki jo povzroča vezava preskusne kemikalije na živa tkiva. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSCodmrlo). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato pa se na teh ponovljenih vzorcih izvede celoten postopek preskušanja, pri čemer pa se v fazi inkubacije MTT inkubirajo z

▼M8

medijem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC_{odmrlo} ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in po možnosti z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odštejeta % NSMTT in % $NSC_{živo}$, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC_{odmrlo}).

29. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc povečajo odčitki izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi mora vsak laboratorij najprej določiti razpon linearnosti svojega spektrofotometra s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7) iz komercialnega vira, šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene. Natančneje, meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno preskusnih kemikalij, ki neposredno zmanjšujejo MTT in povzročajo barvno interferenco, ko so optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, znotraj linearnega razpona spektrofotometra ali ko nepopravljeni delež viabilnosti, dobljen s preskusno kemikalijo, to že opredeljuje kot jedko (glej odstavka 35 in 36). Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo % NSMTT in/ali % $NSC_{živo}$ > 50 % negativne kontrole, obravnavati previdno.

30. Za obarvane preskusne kemikalije, ki zaradi premočnega vplivanja na analizo MTT niso združljive z meritvijo standardne absorbance (OD), se lahko uporabi alternativni postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT (glej odstavek 31) (37). Sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC omogoča, da se formazan MTT loči od preskusne kemikalije pred njegovo kvantifikacijo (38). Iz tega razloga kontrole $NSC_{živo}$ ali NSC_{odmrlo} pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT ali da njena barva ovira oceno sposobnosti za neposredno redukcijo MTT (kot je opisano v odstavku 26). Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odšteje % NSMTT. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter ki ostanejo v tkivih po tretiranju in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušenih izvlečkov tkiv, ki presegajo razpon linearnosti spektrofotometra, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

▼M8

31. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko uporabi tudi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) za merjenje formazana MTT (38). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC je treba ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo (U.S. Food and Drug Administration) v zvezi z bioanalitično metodo validacije (38) (39). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 4. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 4, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in je pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

Merila za sprejemljivost

32. Za vsako preskusno metodo, pri kateri se uporabljajo veljavni modeli rekonstruirane človeške pokožnice, morajo negativna kontrolna tkiva izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, kot je opisana v preglednici 2 in ki ne sme biti nižja od mej, določenih s preteklimi preskusi. Iz tkiv, tretiranih s pozitivno kontrolo, tj. ledocetno kislino ali 8-normalnim KOH, mora biti razvidna sposobnost tkiv, da se odzovejo na jedko kemikalijo v pogojih preskusnega modela (glej Dodatek 2). Variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv preskusne kemikalije in/ali kontrolnih kemikalij mora biti znotraj sprejemljivih mej za zahteve vsakega ustreznega modela rekonstruirane človeške pokožnice (glej Dodatek 2) (npr. razlika v viabilnosti med dvema ponovljenim vzorcema tkiva ne sme presegati 30 %). Če negativna ali pozitivna kontrola, vključena v ponovitev, ni znotraj sprejemljivih razponov, se ponovitev šteje za neveljavno in jo je treba ponoviti. Če je variabilnost preskusnih kemikalij zunaj opredeljenega razpona, je treba njeno preskušanje ponoviti.

Razlaga rezultatov in napovedni model

33. Vrednosti optične gostote, pridobljene za vsako preskusno kemikalijo, je treba uporabiti za izračun deleža viabilnosti celic glede na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Če se uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot delež površine vrha formazana MTT, dobljene z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, glede na vrh formazana MTT, dobljen s sočasno negativno kontrolo. V spodnjih odstavkih 35 in 36 so za vsak preskusni model, zajet s to preskusno metodo, opredeljene mejne vrednosti deleža viabilnosti celic, ki se uporabljajo za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskusnimi kemikalijami (ali za razlikovanje med različnimi podkategorijami jedkosti), ki jih je treba uporabiti pri razlagi rezultatov.

34. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz vsaj dveh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve, je morda treba preučiti drugo preskušanje in nato še tretje, če rezultati prvih dveh preskušanj niso skladni.

35. Napovedni model za preskusni model EpiSkin™ za jedkost za kožo (9) (34) (22), povezan s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, je prikazan v preglednici 4.

▼M8

Preglednica 4

Napovedni model EpiSkin™

Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3, 60 in 240 minut)	Napoved, ki se upošteva
< 35-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	**Jedko:** • Neobvezna podkategorija 1A (*)
≥ 35-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti **IN** < 35-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti **ALI** ≥ 35-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti **IN** < 35-odstotna po 240-minutni izpostavljenosti	**Jedko:** • Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
≥ 35-odstotna po 240-minutni izpostavljenosti	**Nejedka snov**

(*) Glede na podatke, ustvarjene za presojo koristnosti preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice za pomoč pri razvrščanju v podkategorije, se je pokazalo, da približno 22 % rezultatov iz podkategorije 1A preskusnega modela EpiSkin™ dejansko lahko predstavlja snovi/zmesi iz podkategorije 1B ali 1C (tj. razvrstitve v previsoko podkategorijo) (glej Dodatek 3).

36. Napovedni modeli za preskusne modele jedkosti za kožo EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) in epiCS® (16) (23) (37), povezani s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®

Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3 in 60 minut)	Napoved, ki se upošteva
1. KORAK za EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®	
< 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	**Jedka snov**
≥ 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti **IN** < 15-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti	**Jedka snov**
≥ 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti **IN** ≥ 15-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti	**Nejedka snov**
2. KORAK za EpiDerm™ SCT – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke	
< 25-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 25-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
2. KORAK za SkinEthic™ RHE – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke	
< 18-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Neobvezna podkategorija 1A *

▼M8

Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3 in 60 minut)	Napoved, ki se upošteva
1. KORAK za EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®	
≥ 18-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
2. KORAK za epiCS® – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke	
< 15-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 15-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

37. Za vsako preskušanje je treba podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in izračunani delež viabilnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrstitvijo) v poročilu navesti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih poskusov. Poleg tega je treba v poročilu za vsak preskus navesti srednje vrednosti in razpone viabilnosti in KV med ponovljenimi vzorci tkiv. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene interakcije med reagentom MTT in snovmi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, ali obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

Poročilo o preskusu

38. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:

— Snov iz ene sestavine kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

— fizični videz, topnost v vodi in morebitne dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— vir, številka serije, če je na voljo;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;

— pogoji skladiščenja.

Uporabljena model in protokol rekonstruirane človeške pokožnice ter njuna utemeljitev (če je ustrezno)

Preskusni pogoji:

— uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice (vključno s številko serije);

▼**M8**

— podatki o umerjanju za merilno napravo (npr. spektrofotometer), valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljajo za kvantifikacijo formazana MTT, ter razpon linearnosti merilne naprave;

— opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;

— opis ustreznosti sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno;

— popolne informacije v podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:

i) viabilnost;

ii) pregradno funkcijo;

iii) morfologijo;

iv) obnovljivost in napovedljivost;

v) kontrole kakovosti modela:

— navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;

— dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti.

Preskusni postopek:

— podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku (vključno s postopki spiranja, ki se uporabijo po obdobju izpostavljenosti);

— odmerki uporabljene preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij;

— trajanje obdobij izpostavljenosti in temperature izpostavljenosti;

— navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;

— število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola in NSMTT, NSCživo in NSCodmrlo, če je ustrezno), za vsak čas izpostavljenosti;

— opis uporabljenih meril za odločanje/napovednega modela na podlagi uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice;

— opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka (vključno s postopki spiranja).

Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa:

— srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;

— sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;

▼M8

— sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

Rezultati:

— preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah in kontrolah za vsako obdobje izpostavljenosti, vsako ponovitev preskusa in vsako ponovljeno meritev, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv, razlikami med ponovljenimi vzorci, standardnimi odkloni in/ali KV, če je ustrezno;

— če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali barvilne preskusne kemikalije, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, % NSMTT, % NSCživo, % NSCodmrlo, razlikami med ponovljenimi vzorci tkiv, standardnimi odkloni in/ali KV (če je ustrezno), ter končni pravilni delež viabilnosti tkiv;

— rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi kemikalijami, glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;

— opis drugih opaženih učinkov;

— izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) ZN (2013). Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.

(3) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*.

(4) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.

(5) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., in Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219–255.

(8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., in Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471–482.

▼**M8**

(9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483–524.

(10) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M., in Holzhütter, H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., in Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129–147.

(12) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikacija NIH št. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.

(13) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikacija NIH št. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NJ, ZDA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. april 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21. marec 2000.

(16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. J., Vohr, H. W., in Fuchs, H. W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová, H., Liebsch, M., Spielmann, H., Genschow, E., Schmidt E., Traue, D., Guest, R., Whittingham, A., Warren, N., Gamer, A. O., Remmele, M., Kaufmann, T., Wittmer, E., De Wever, B., in Rosdy, M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier, C., Roquet, M., in Fraissinette, A. B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17. november 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12. junij 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 190). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(22) Alépée, N., Grandidier, M. H., in Cotovio, J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131–145.

(23) Desprez, B., Barroso, J., Griesinger, C., Kandárová, H., Alépée, N., in Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 219). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(26) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55–63.

(28) Tinois, E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* V: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier, A., Goldberg, A. M., in Maibach, H. I. (ur.): 133-140.

(29) Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., in Klausner M. (1994). New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889–891.

(30) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J., in Mommaas, M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211–225.

(31) Tinois, E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., in Thivolet, J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310–319.

(32) Parenteau, N. L., Bilbo, P., Nolte, C. J., Mason, V. S., in Rosenberg, M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., in Parenteau, N. L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747–756.

(34) EpiSkin™ SOP (december 2011). *INVITTOX* Protocol (št. 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (februar 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (januar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (januar 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) Cell-Systems.

(38) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., in McNamee, P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (maj 2001). Na voljo na: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (25).

Viabilnost celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro), ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali viabilnostjo živih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušenih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (25).

ET_{50}: lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije, glej tudi IC_{50}.

GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

IC_{50}: lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC_{50}), glej tudi ET_{50}.

Prevelik odmerek: količina na pokožnico nanesene preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine pokožnice.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

▼**M8**

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NJ: nejedko.

Kontrola NSC_{odmrlo}: kontrola z nespecifično barvo v odmrlih tkivih.

Kontrola $NSC_{živo}$: kontrola z nespecifično barvo v živih tkivih.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT.

OD: optična gostota.

PC: pozitivna kontrola, ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Standardi izvajanja (SI): standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (25).

Ustreznost: opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (25).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (25).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušenih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (25).

▼**M8**

Jedkost za kožo *in vivo*: nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (25).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UPLC: tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼M8

Dodatek 2

GLAVNI ELEMENTI PRESKUSNIH MODELOV REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE, VALIDIRANIH ZA PRESKUŠANJE JEDKOSTI ZA KOŽO

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Površina modela	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Število ponovljenih vzorcev tkiv	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.	2–3 za vsak čas izpostavljenosti.	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.
Odmerki pri tretiranju in nanos	Tekočine in viskozne snovi: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2). Trdne snovi: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl raztopine NaCl (9 g/l). Voskaste/lepljive snovi: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) z najlonsko mrežico.	Tekočine: 50 µl (79,4 µl/cm^2) z najlonsko mrežico ali brez nje. *Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.* Poltrdne snovi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Trdne snovi: 25 µl H_2O (ali več, če je potrebno) + 25 mg (39,7 mg/cm^2). Voski: ploščat ‚kolutast‘ kos premera približno 8 mm, nameščen na vrhu tkiva, namočenega v 15 µl H_2O.	Tekočine in viskozne snovi: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) z uporabo najlonske mrežice. *Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.* Trdne snovi: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2). Voskaste/lepljive snovi: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) z uporabo najlonske mrežice.	Tekočine: 50 µl (83,3 µl/cm^2) z uporabo najlonske mrežice. *Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.* Poltrdne snovi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Trdne snovi: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (ali več, če je potrebno). Voskaste snovi: ploščat okrogel kos premera približno 8 mm, nameščen na vrhu tkiva, namočenega v 15 µl H_2O.
Predhodno preverjanje neposredne redukcije MTT	50 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml raztopine 180 ± 5 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi v vodi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov)+ 1 ml MTT 1 mg/ml raztopine 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi zaradi zamrznitve.	40 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov)+ 1 ml MTT 1 mg/ml raztopine 180 ± 15 min pri 37 oC, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi zaradi zamrznitve.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov)+ 1 ml MTT 1 mg/ml raztopine 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi zaradi zamrznitve.

▼M8

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Predhodno preverjanje barvne interference	10 µl (tekočina) ali 10 mg (trdna snov) + 90 µl H_2O se 15 min mešata pri sobni temperaturi → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 300 µl H_2O 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	40 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov) + 300 µl H_2O se 60 min mešata pri sobni temperaturi → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 300 µl H_2O 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.
Izpostavljenost in temperatura izpostavljenosti	3 min, 60 min (± 5 min) in 240 min (± 10 min) v prezračevanem prostoru, sobna temperatura (18–28 °C).	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost
Spiranje	25 ml 1x PBS (2 ml/posamezno spiranje).	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.
Negativna kontrola	50 µl raztopine NaCl (9 g/l) preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	50 µl H_2O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	40 µl H_2O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	50 µl H_2O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.
Pozitivna kontrola	50 µl ledocetne kisline preskuša se samo 4 ure.	50 µl 8-normalnega KOH preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	40 µl 8-normalnega KOH preskuša se samo 1 uro.	50 µl 8-normalnega KOH preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.
Raztopina MTT	2 ml 0,3 mg/ml.	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml
Čas in temperatura inkubacije MTT	180 min (± 15 min) pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min (±15 min) pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotna relativna vlažnost.

▼M8

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Ekstrakcijsko topilo	500 µl nakisanega izopropanola (0,04 N HCl v izopropanolu) (izolirano tkivo v celoti potopljeno).	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).
Čas in temperatura ekstrakcije	Čez noč pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.
Odčitek optične gostote	570 nm (545–595 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (ali 540 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra	540–570 nm brez referenčnega filtra
Kontrola kakovosti tkiva	18-urno tretiranje s SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml.	Tretiranje z 1-odstotnim Tritonom X-100 4,08 ure ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ure.	Tretiranje z 1-odstotnim Tritonom X-100 4,0 ure ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ure.	Tretiranje z 1-odstotnim Tritonom X-100 2,0 ure ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ure.
Merila za sprejemljivost	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (NaCl), mora biti ≥ 0,6 in ≤ 1,5 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 4 ure izpostavljenih pozitivni kontroli (ledocetna kislina), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti ≤ 20 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote ≥ 0,3 razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H_2O), mora biti ≥ 0,8 in ≤ 2,8 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti < 15 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti mora biti koeficient variacije (KV) med ponovljenimi vzorci tkiv ≤ 30 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H_2O), mora biti ≥ 0,8 in ≤ 3,0 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro (in 4 ure, če je to ustrezno) izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti < 15 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote ≥ 0,3 razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H_2O), mora biti ≥ 0,8 in ≤ 2,8 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti < 20 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote ≥ 0,3 razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.

▼**M8**

Dodatek 3

UČINKOVITOST PRESKUSNIH MODELOV PRI RAZVRŠČANJU V PODKATEGORIJE

V spodnji preglednici je prikazana učinkovitost štirih preskusnih modelov, izračunana na podlagi skupine 80 kemikalij, ki so jih preskusili razvijalci štirih preskusov. Izračune je opravil sekretariat OECD, pregledala in potrdila pa jih je podskupina strokovnjakov (21) (23).

Preskusni modeli EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ in epiCS® omogočajo razvrščanje v podkategorije (tj. 1A, 1B ali 1C ali NJ).

Učinkovitosti, stopnje razvrstitve v previsoko podkategorijo, stopnje razvrstitve v prenizko podkategorijo in točnost (napovedovalna zmogljivost) štirih preskusnih modelov na podlagi skupine 80 kemikalij, ki so bile vse preskušene z dvema ali tremi ponovitvami pri vsakem preskusnem modelu, so navedene v spodnji preglednici.

STATISTIČNI PODATKI O NAPOVEDIH, DOBLJENIH NA PODLAGI CELOTNE SKUPINE KEMIKALIJ

(n = 80 kemikalij, preskušenih v dveh neodvisnih ponovitvah za epiCS® ali treh neodvisnih ponovitvah za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ in SkinEthic™ RHE, tj. 159 (*) oziroma 240 razvrstitev)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Razvrstitve v previsoko podkategorijo:				
1B in 1C previsoko razvrščeni v podkategorijo 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NJ previsoko razvrščena v podkategoriji 1B in 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NJ previsoko razvrščena v podkategorijo 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Popr. razvrstitev v previsoko podkat.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Skupna stopnja razvrstitve v previsoko podkategorijo (vse kategorije)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Razvrstitve v prenizko podkategorijo:				
1A prenizko razvrščena v podkategoriji 1B in 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A prenizko razvrščena v podkategorijo NJ	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B in 1C prenizko razvrščeni v podkategorijo NJ	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Skupna stopnja razvrstitve v prenizko podkategorijo (vse kategorije)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Pravilne razvrstitve v podkategorije:				
Pravilna razvrstitev v podkategorijo 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Pravilna razvrstitev v podkategorijo 1B in/ali 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Pravilna razvrstitev v podkategorijo NJ	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Splošna točnost	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Nejedka snov

(*) Ena kemikalija se je pri epiCS® preskusila enkrat, ker ni bila na voljo (23).

▼**M8**

Dodatek 4

Ključni parametri in merila sprejemljivosti za ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT, ekstrahiranega iz tkiva rekonstruirane človeške pokožnice

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (37) (38)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz živih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz odmrlih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja).	$Površina_{interferenca} \leq 20$ % $površine_{LLOQ}$ ([1]).
Natančnost	Kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	KV ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	% Dev ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	85 % ≤ vpliv matriksa % ≤ 115 %.
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ ([2]).	$Površina_{interferenca} \leq 20$ % $površine_{LLOQ}$.
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: % Dev ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ. Kontrole kakovosti: % Dev ≤ 15 % in KV ≤ 15 %.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	% Dev ≤ 15 %.
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri določeni temperaturi (npr. 4 °C, –20 °C, –80 °C).	% Dev ≤ 15 %.

([1]) LLOQ: spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

([2]) ULOQ: zgornja meja določljivosti (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol, tj. 200 µg/ml.

▼B

B.41 PRESKUS FOTOTOKSIČNOSTI 3T3 NRU IN *VITRO*

1. METODA

Ta preskusna metoda je enakovredna OECD TG 432 (2004).

1.1 UVOD

Fototoksičnost je opredeljena kot toksična reakcija snovi, nanesene na telo, ki se sproži ali bolj izrazi (razvidno pri manjših odmerkih) po naknadni izpostavljenosti svetlobi, ali se sproži z obsevanjem kože po sistemskem dajanju kemikalije.

S preskusom fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* se ugotavlja fototoksični potencial preskušane snovi, ki ga izzove vzbujena kemikalija po izpostavljenosti svetlobi. V preskusu se določa fotocitotoksičnost na podlagi relativnega zmanjšanja viabilnosti celic izpostavljenih kemikaliji v prisotnosti in odsotnosti svetlobe. Snovi, ki jih določimo s tem preskusom, so najverjetneje fototoksične *in vivo* po sistemskem dajanju in porazdelitvi po koži ali po površinskem nanosu na kožo.

Za več vrst kemikalij je bilo ugotovljeno, da sprožajo fototoksične učinke (1) (2) (3) (4). Njihova edina skupna lastnost je sposobnost, da v območju sončne svetlobe absorbirajo svetlobno energijo. Po prvem zakonu fotokemije (Grotthaus-Draperjev zakon) zahteva fotoreakcija zadostno absorpcijo svetlobnih kvantov. Še preden se začne razmišljati o biološkem preskušanju je zato po Smernici za preskušanje OECD 101 pri preskušani kemikaliji treba določiti absorpcijski spekter UV/vidne svetlobe. Predlagano je bilo, da kemikalija zelo verjetno ni fotoreaktivna, če je koeficient molarne ekstinkcije/absorpcije manjši od 10 litrov × mol^{-1} × cm^{-1}. Te kemikalije ni treba preskušati niti v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* niti v katerem koli drugem biološkem preskusu škodljivih fotokemijskih učinkov (1)(5). Glej tudi Dodatek 1.

Zanesljivost in pomen preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* sta bila nedavno ovrednotena (6) (7) (8) (9). Dokazali so, da preskus fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* napoveduje akutne fototoksične učinke pri živalih in ljudeh *in vivo*. Preskus ni namenjen napovedovanju drugih škodljivih učinkov, ki lahko nastanejo zaradi kombiniranega delovanja kemikalije in svetlobe, npr. ne obravnava fotogenotoksičnosti, fotoalergenosti ali fotorakotvornosti niti ne omogoča ocenjevanja fototoksičnega potenciala. Prav tako preskus ni bil zasnovan za obravnavanje posrednih mehanizmov fototoksičnosti, učinkov presnovkov preskušane snovi ali učinkov zmesi.

Medtem ko je uporaba presnovnih sistemov splošna zahteva za vse preskuse *in vitro* za napovedovanje genotoksičnega in karcinogenega potenciala, so se doslej v primeru fototoksikologije pojavili le redki primeri, kjer je potrebna presnovna transformacija, da bi kemikalija učinkovala kot fototoksin *in vivo* ali *in vitro*. Zaradi tega ni niti potrebno niti znanstveno upravičeno, da se pričujoči preskus opravi s sistemom za aktivacijo presnove.

▼B

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Obsevanje: intenziteta ultravijolične (UV) ali vidne svetlobe, ki doseže površino, merjena v W/m ali mW/cm^2.

Odmerek svetlobe: količina (= intenziteta x čas) ultravijoličnega (UV) ali vidnega sevanja, ki doseže površino, izražena v joulih (= W x s) na enoto površine, npr. J/m ali J/cm^2.

Valovni pasovi UV-svetlobe: oznake, ki jih priporoča CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), so: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) in UVC (100–280 nm). Uporabljajo se tudi druge oznake; ločnica med UVB in UVA je pogosto pri 320 nm, UVA pa se lahko razdeli v UV-A1 in UV-A2, pri čemer je ločnica pri približno 340 nm.

Viabilnost celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti populacije celic (npr. sprejemanje vitalnega barvila nevtralno rdeče v celične lizosome), ki se glede na merjeni ciljni učinek in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo celic.

Relativna viabilnost celic: viabilnost celic, izražena glede na kontrole s topilom (negativne kontrole), ki potekajo ves čas preskusnega postopka (bodisi +Irr bodisi -Irr), vendar se ne obdelajo s preskušano kemikalijo.

PIF (faktor fotoiritacije): faktor, pridobljen s primerjanjem dveh enako učinkovitih citotoksičnih koncentracij (IC50) preskušane kemikalije, dobljenih v odsotnosti (- Irr) in v prisotnosti (+ Irr) necitotoksičnega obsevanja z UV A/vi dno svetlobo.

IC_{50}: koncentracija preskušane kemikalije, pri kateri se viabilnost celic zmanjša za 50 %.

MPE (srednji fotoučinek): meritev, izpeljana iz matematične analize celotne oblike krivulj reakcije na dve koncentraciji, pridobljenih v odsotnosti (-Irr) in v prisotnosti (+Irr) necitotoksičnega obsevanja z U V A/vi dno svetlobo.

Fototoksičnost: akutna toksična reakcija, ki nastane po prvotni izpostavljenosti kože nekaterim kemikalijam in naknadni izpostavljenosti svetlobi, ali se podobno sproži z obsevanjem kože po sistemskem dajanju kemikalije.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskus fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* temelji na primerjavi citotoksičnosti kemikalije, kadar se preskuša v prisotnosti in v odsotnosti izpostavljenosti necitotoksičnemu odmerku simulirane sončne svetlobe. Citotoksičnost se v tem preskusu izraža kot od koncentracije odvisno zmanjšanje sprejemanja vitalnega barvila nevtralno rdeče 24 ur po obdelovanju s preskušano kemikalijo in obsevanju (10). NR je šibko kationsko barvilo, ki zlahka prehaja celične membrane neodvisno od difuzije in se znotraj celično kopiči v lizosomih. Spremembe površine občutljive membrane lizosomov povzročijo krhkost lizosomov in druge spremembe, ki postopno postanejo nepovratne. Te spremembe izzovejo učinki ksenobiotikov in posledica je zmanjšano sprejemanje NR. Zato je mogoče razlikovati med viabilnimi, poškodovanimi in odmrlimi celicami, kar je osnova preskusa.

▼B

Celice Balb/c 3T3 se kultivirajo 24 ur, da se oblikujejo enoslojne celične plasti. Dve 96-kanalni plošči na eno preskušano kemikalijo se nato eno uro predinkubirata z osmimi različnimi koncentracijami preskušane snovi. Nato se ena od obeh plošč izpostavi največjemu necitotoksičnemu odmerku obsevanja, medtem ko druga plošča ostane v temi. Na obeh ploščah se nato gojišče za obdelovanje nadomesti z umetnim gojiščem, po nadaljnjih 24 urah inkubacije pa se viabilnost celic določa s sprejemanjem nevtralno rdečega. Viabilnost celic, izražena kot odstotek neobdelanih kontrol s topilom, se izračuna za vsako preskusno koncentracijo. Za napoved fototoksičnega potenciala se reakcije na koncentracije, pridobljene v prisotnosti in v odsotnosti obsevanja, med seboj primerjajo, običajno na ravni IC_{50}, tj. pri koncentraciji, ki viabilnost celic v primerjavi z neobdelanimi kontrolami zmanjša za 50 %.

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Priprave**

1.4.1.1 *Celice*

V validacijski študiji je bila uporabljena stalna celična linija mišjih fibroblastov, Balb/c 3T3, klon 31, bodisi iz zbirke American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, ZDA, bodisi iz zbirke European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Združeno Kraljestvo, zato je priporočljivo, da jo pridobite iz uveljavljene zbirke celic. Z istim preskusnim postopkom je mogoče uspešno uporabiti tudi druge celice ali celične linije, če so pogoji gojenja prilagojeni specifičnim potrebam celic, vendar pa je treba dokazati enakovrednost.

Celice je treba redno preverjati glede odsotnosti kontaminacije z mikoplazmami, uporabiti pa se smejo le, če jih v celicah ni (11).

Pomembno je, da se občutljivost celic za UV redno preverja v skladu s postopkom kontrole kakovosti, opisanim v tej metodi. Ker se občutljivost celic za UVA lahko poveča s številom pasaž, je treba uporabiti celice Balb/c 3T3 z najmanjšim možnim številom pasaž, po možnosti nižjim od 100. (Glej oddelek 1.4.2.2.2 in Dodatek 2).

1.4.1.2 *Gojišča in pogoji gojenja*

Tako za rutinske pasaže celic kot med samim preskusnim postopkom je treba uporabiti ustrezna gojišča kuture in ustrezne inkubacijske pogoje, npr. za celice Balb/c 3T3 so to DMEM (Eaglovo gojišče modificirano po Dulbeccu) z dodatkom 10-odstotnega seruma novorojenih telet, 4 mM glutamina, penicilina (100 R7) in streptomicina (100 μg/mL) ter odvisno od pufira inkubacija v vlažnem ozračju pri 37 °C v 5–7,5 % CO_2 (glej oddelek 1.4.1.4, drugi odstavek). Pri tem je še zlasti pomembno, da pogoji ravnanja s celično kulturo zagotavljajo čas za celični cikel v okviru običajnih historičnih meja, ki veljajo za uporabljene celice ali celične linije.

1.4.1.3 *Priprava kultur*

Celice iz zamrznjenih založnih kultur se v umetno gojišče zasejejo v ustrezni gostoti in se ponovno kultivirajo vsaj enkrat, preden se uporabijo v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro*.

▼B

Celice za preskus fototoksičnosti se v umetno gojišče zasejejo v takšni gostoti, da kulture do konca preskusa ne postanejo strnjene, tj. ko se 48 ur po zasejanju celic določa viabilnost celic. Za celice Balb/c 3T3, ki se kultivirajo v 96-kanalnih ploščah, se priporoča zasejanje z gostoto celic 1×10^4 celic na kanal.

Za vsako preskušano kemikalijo se celice enako zasejejo v dve ločeni 96-kanalni plošči, ki gresta nato hkrati čez celotni preskusni postopek pod enakimi pogoji gojenja, razen časovnega obdobja, v katerem se ena plošča obseva (+ Irr), druga pa ostane v temi (- Irr).

1.4.1.4 *Priprava preskušane snovi*

Preskušane snovi je treba sveže pripraviti tik pred uporabo, razen če podatki potrjujejo njihovo stabilnost med hranjenjem. Priporočljivo je, da se vsi postopki s kemikalijo in začetno obdelovanje celic izvajajo v pogojih svetlobe, ki preprečijo fotoaktivacijo ali razgradnjo preskušane snovi pred obsevanjem.

Preskušane kemikalije je treba raztopiti v pufrskih raztopinah soli, npr. Earlovi uravnoteženi raztopini soli (EBSS) ali drugi fiziološko uravnoteženi pufrski raztopini, v katerih zato, da med obsevanjem ne pride do interference, ne sme biti beljakovinskih sestavin in sestavin, ki absorbirajo svetlobo (npr. pH-indikatorskih barv in vitaminov). Ker so celice med obsevanjem približno 50 minut izven inkubatorja s CO_2, je treba izvesti ustrezne ukrepe za preprečitev alkalinizacije. Če se uporabljajo šibki pufri, kot je EBSS, se lahko to doseže z inkubiranjem celic v 7,5 % CO_2. Če se celice inkubirajo samo v 5 % CO_2, je treba izbrati močnejši pufer.

Preskušane kemikalije z omejeno topnostjo v vodi je treba raztopiti v ustreznem topilu. Če se uporabi topilo, mora imeti stalni volumen v vseh kulturah, tj. v negativnih kontrolah (s topilom) in v vseh koncentracijah preskušane kemikalije, in mora biti v vseh koncentracijah necitotoksično. Koncentracije preskušane kemikalije je treba izbrati tako, da ne nastajajo oborine ali motne raztopine.

Priporočeni topili sta dimetilsulfoksid (DMSO) in etanol (EtOH). Primerna so lahko tudi druga topila z nizko citotoksičnostjo. Pred uporabo je treba pri vseh drugih topilih skrbno preveriti specifične lastnosti, npr. reagiranje s preskušano kemikalijo, izničenje fototoksičnega učinka, lovljenje radikalov in/ali stabilnost kemikalije v topilu.

Za boljšo topnost se lahko uporabi vrtinčno mešanje in/ali uporaba ultrazvoka in/ali segrevanje na ustrezno temperaturo, razen če to vpliva na stabilnost preskušane kemikalije.

▼B

1.4.1.5 *Pogoji obsevanja*

1.4.1.5.1 Vir svetlobe

Izbira primernega vira svetlobe in ustreznega filtra je ključni dejavnik pri preskušanju fototoksičnosti. UVA in vidna območja so navadno povezana s pojavom fototoksičnih reakcij *in vivo* (3) (12), medtem ko je UVB na splošno manj pomemben in močno citotoksičen, saj svojo citotoksičnost med 313 in 280 nm poviša tisočkrat (13). Merila za izbiro ustreznega vira svetlobe morajo vključevati bistveno zahtevo, da vir svetlobe oddaja valovne dolžine, ki jih preskušana kemikalija absorbira (absorpcijski spekter), ter da mora odmerek svetlobe (ki ga je mogoče doseči v razumnem času izpostavljenosti) zadostovati za odkrivanje znanih fotocitotoksičnih kemikalij. Nadalje uporabljene valovne dolžine in odmerki ne smejo po nepotrebnem škodovati preskusnemu sistemu, npr. oddajanje toplote (infrardeče območje).

Simulacija sončne svetlobe s solarnimi simulatorji velja za optimalni umetni vir svetlobe. Porazdelitev obsevalne moči filtriranega solarnega simulatorja mora biti podobna sončni svetlobi na odprtem, ki je prikazana v (14). V solarnih simulatorjih se uporabljajo tako ksenonove obločne svetilke kakor (dopirane) živosrebrove kovinske halogenidne obločne svetilke (15). Slednje imajo prednost, da oddajajo manj toplote in da so cenejše, vendar je ujemanje s sončno svetlobo manj popolno kot pri ksenonovih obločnih svetilkah. Ker vsi solarni simulatorji oddajajo precejšnje količine UVB, jih je treba ustrezno filtrirati, da se oslabijo močno citotoksične valovne dolžine UVB. Ker vsi plastični materiali, iz katerih so izdelane posode za gojenje celic, vsebujejo UV stabilizatorje, je treba spekter meriti skozi pokrov enake vrste 96-kanalne plošče, kot se uporabi v preskusu. Ne glede na uporabljene ukrepe za oslabitev posameznih delov spektra s filtracijo ali z nenamernimi filtracij skimi učinki opreme spekter, zabeležen pod temi filtri, ne sme odstopati od standardizirane sončne svetlobe na odprtem (14). Primer spektralne razdelitve obsevanja filtriranega solarnega simulatorja, uporabljenega v validacijski študiji preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro,* je bil objavljen v (8) (16). Glej tudi sliko 1 v Dodatku 2.

1.4.1.5.2 Dozimetrija

Pred vsakim preskusom fototoksičnosti je treba redno preverjati intenzivnost svetlobe (obsevanja), in sicer z uporabo primernega širokospektralnega UV-metra. Intenzivnost je treba meriti skozi pokrov enake vrste 96-kanalne plošče, kot se uporabi v preskusu. UV-meter je treba predhodno kalibrirati za vir svetlobe. Preveriti je treba delovanje UV-metra in v ta namen se priporoča uporaba drugega, referenčnega UV-metra iste vrste in iste kalibracije. Idealno je treba pri večjih intervalih uporabiti spektroradiometer, da se meri spektralno sevanje filtriranega vira svetlobe in preveri kalibracija širokospektralnega UV-metra.

Ugotovljeno je bilo, da odmerek v višini 5 J/cm (izmerjen v območju UVA) ni citotoksičen za celice Balb/c 3T3 in da je dovolj močan, da vzbudi kemikalije, da povzročijo fototoksične reakcije, (6)(17); za 5 J/cm v časovnem obdobju 50 min, je bilo obsevanje prilagojeno na 1,7mW/cm2. Glej sliko 2 v Dodatku 2. Če se uporabi druga celična linija ali drugačen vir svetlobe, je morda potrebna kalibracija odmerka obsevanja, da se izbere odmerek, ki ni škodljiv za celice in zadosti močen za zaznavanje standardnih fototoksinov. Čas izpostavljenosti svetlobi se izračuna takole:

▼B

$$t(\min) = \frac{\text{odmerek obsevanja } (J/cm^2) \times 1000}{\text{sevanje } (mW/cm^2) \times 60} \quad t(\min) = (1J = 1\ Ws)$$

1.4.2 **Preskusni pogoji**

1.4.2.1 *Koncentracije preskušane snovi*

Razpon koncentracij kemikalije, ki se preskuša v prisotnosti (+ Irr) in v odsotnosti (- Irr) svetlobe, je treba ustrezno določiti v predhodnih poskusih za ugotavljanje razpona odmerka. Morda je uporabno določiti topnost na začetku in po 60 minutah (oziroma uporabljenem trajanju obdelovanja), saj se lahko topnost spreminja s časom in med izpostavljenostjo. Da se prepreči toksičnost zaradi nepravilnih pogojev gojenja ali zelo kislih oziroma alkalnih kemikalij, mora biti pH celičnih kultur z dodano preskušano kemikalijo v mejah 6,5–7,8.

Najvišja koncentracija preskušane snovi mora biti v fizioloških pogojih preskusa, npr. preprečiti je treba osmotske in pH strese. Odvisno od preskušane kemikalije je morda treba razmisliti o drugih fizikalno-kemij skih lastnostih, ki omejujejo najvišjo koncentracijo v preskusu. Pri relativno netopnih snoveh, ki niso toksične pri koncentracijah do nasičenja, je treba preskušati najvišjo dosegljivo koncentracijo. Na splošno je treba preprečiti obarjanje preskušane kemikalije v kateri koli preskusni koncentraciji. Maksimalna koncentracija preskušane snovi ne sme preseči 1 000 μg/mL; osmolarnost ne sme preseči 10 mmol. Uporabiti je treba geometrična zaporedja koncentracij po osem koncentracij preskušane snovi s konstantnim faktorjem razredčevanja (glej oddelek 2.1, drugi odstavek).

Če obstajajo podatki (iz poskusa za ugotavljanje razpona), da preskušana kemikalija ni citotoksična do mejne koncentracije v temnem poskusu (- Irr), vendar je zelo citotoksična pri obsevanju (+ Irr), se bodo razponi koncentracij, namenjeni preskus (+ Irr) morda morali razlikovati od koncentracij za preskus (- Irr), da bo izpolnjena zahteva glede ustrezne kakovosti podatkov.

1.4.2.2 *Kontrole*

1.4.2.2.1 Občutljivost celic za obsevanje, ugotavljanje historičnih podatkov:

Pri celicah je treba redno (približno vsako peto pasažo) preverjati občutljivost za vir svetlobe z ocenjevanjem njihove viabilnosti po izpostavitvi povečuj očim odmerkom obsevanja. V tej oceni je treba uporabiti več odmerkov obsevanja, vključno z ravnmi, ki so znatno večje od ravni, uporabljenih v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU. Te odmerke je najlažje številčno ovrednotiti z merjenjem UV-območja vira svetlobe. Celice se zasejejo z gostoto, ki se uporablja pri preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* in so obsevane naslednji dan. Po enem dnevu se določi viabilnost celic na podlagi sprejemanja nevtralno rdečega. Nato je treba dokazati, da je bil ugotovljeni največji necitotoksični odmerek (npr. v validacijski študiji je bil 5 J/cm [UVA]) zadosten za pravilno razvrstitev referenčnih kemikalij (tabela 1).

▼B

1.4.2.2.2 Občutljivost za sevanje, preverjanje trenutnega preskusa:

Preskus izpolnjuje merila kakovosti, če je viabilnost obsevanih negativnih kontrol/kontrol s topilom večja od 80 % viabilnosti neobsevanih negativnih kontrol/kontrol s topilom.

1.4.2.2.3 Viabilnost kontrol s topilom:

Absolutna optična gostota ($OD_{540\ NRU}$), merjena v ekstraktu nevtralno rdečega iz kontrol s topilom, pokaže, ali je 1×10^4 celic, zasejanih v vsak posamezni kanal, v dveh dneh preskusa zraslo z običajno hitrostjo podvajanja. Preskus izpolnjuje merila sprejemljivosti, če je srednja vrednost $OD_{540\ NRU}$ neobdelanih kontrol > 0,4 (tj. približno dvajsetkratnik odzadnje absorbance topila).

1.4.2.2.4 Pozitivna kontrola:

Skupaj z vsakim preskusom fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro* se obenem preskuša tudi znana fototoksična kemikalija. Priporoča se klorpromazin (CPZ). Za CPZ, ki se je preskušal s standardnim protokolom v preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro,* so bila opredeljena naslednja merila sprejemljivosti: obsevani CPZ (+ Irr): IC_{50} = 0,1 do 2,0 μg/mL, neobsevani CPZ (Irr): IC_{50} = 7,0 do 90,0 μg/mL. Faktor fotoiritacije (PIF) mora biti > 6. Spremljati je treba historične rezultate pozitivne kontrole.

Namesto klorpromazina se lahko kot hkratna pozitivna kontrola uporabijo tudi druge fototoksične kemikalije, ki ustrezajo vrsti kemikalije, ki se vrednoti, ali njenim značilnostim glede topnosti.

1.4.3 **Preskusni postopek (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1 *Prvi dan:*

Odmeriti 100 μL umetnega gojišča v stranske kanale ene 96-kanalne mikrotitrske plošče (= slepi vzorci). V preostale kanale razdeliti 100 μL celične suspenzije z 1×10^5 celicami/mL (= 1×10^4 celic/kanal). Za vsako zaporedje koncentracij posamezne preskušane snovi in za kontrolo s topilom ter pozitivno kontrolo je treba pripraviti dve plošči.

Celice inkubirati 24 ur (glej oddelek 1.4.1.2), dokler ne oblikujejo na pol strnjene enoslojne plasti. S takšnim inkubacijskim časom se zagotovijo okrevanje celic, pritrjevanje in eksponentna rast.

1.4.3.2 *Drugi dan:*

Po inkubaciji odcediti umetno gojišče s celic in jih dvakrat previdno sprati s 150 μL pufrske raztopine, ki se je uporabila za inkubacijo. Dodati 100 μL pufra, ki vsebuje ustrezno koncentracijo preskušane kemikalije ali topila (kontrola s topilom). Uporabiti 8 različnih koncentracij preskušane kemikalije. Celice s preskušano kemikalijo v temi inkubirati 60 minut (glej oddelek 1.4.1.2 in 1.4.1.4, drugi odstavek).

Izmed obeh plošč, ki so bile pripravljene za vsako zaporedje koncentracije preskušane snovi in kontrole, se naključno izbere ena za določevanje citotoksičnosti (- Irr) (tj. kontrolna plošča) in ena za določevanje fotocitotoksičnosti (+ Irr) (tj. obdelovalna plošča).

▼B

Za izvedbo +Irr izpostavljanja celice pri sobni temperaturi obsevati 50 minut prek pokrova 96-kanalne plošče z največjim necitotoksičnim odmerkom sevanja (glej tudi Dodatek 2). Neobsevane plošče (- Irr) zadržati pri sobni temperaturi 50 minut v temni škatli (= trajanje izpostavljenosti svetlobi).

Odcediti preskusno raztopino in dvakrat previdno sprati s 150 µL pufrske raztopine, ki se je uporabila za inkubacijo in ki ne vsebuje preskušanega materiala. Zamenjati pufer z umetnim gojiščem in inkubirati (glej oddelek 1.4.1.2) čez noč (18–22 ur).

1.4.3.3 *Tretji dan:*

1.4.3.3.1 Mikroskopsko vrednotenje

Celice je treba preučiti za rast, morfologijo in neokrnjenost enoslojne plasti pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Zabeležiti je treba spremembe celične morfologije in učinke na rast celic.

1.4.3.3.2 Preskus sprejemanja nevtralno rdečega

Celice sprati s 150 µL predhodno segretega pufra. Raztopino za spiranje odstraniti z rahlim stresanjem. Dodati 100 µL nevtralno rdečega (NR) v koncentraciji 50 µg/mL (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid, številka Einecs 209-035-8; številka CAS 553-24-2; C.I. 50040) v gojišču brez seruma (16) in 3 ure inkubirati, kakor je opisano v odstavku 1.4.1.2. Po inkubaciji odstraniti gojišče z NR in celice sprati s 150 µL pufra. Odliti in odstraniti odvečni pufer s pivnanjem ali centrifugiranjem.

Dodati natančno 150 µL raztopine za desorpcijo NR (sveže pripravljeno zmes 49 delov vode + 50 delov etanola + 1 del ocetne kisline).

Deset minut nežno stresati mikrotitrsko ploščo na stresalniku za mikrotitrske plošče, dokler se NR ne ekstrahira iz celic in tvori homogeno raztopino.

Optično gostoto ekstrakta NR izmeriti pri 540 nm v spektrofotometru, slepe vzorce uporabiti kot referenco. Podatke shraniti v ustreznem elektronskem datotečnem formatu za naknadno analizo.

2. **PODATKI**

2.1 KAKOVOST IN KOLIČINA PODATKOV

Podatki iz preskusa naj omogočajo smiselno analizo povezave koncentracija-reakcija, pridobljene v prisotnosti in v odsotnosti obsevanja, in, če je možno, koncentracije preskušane kemikalije, pri kateri se je viabilnost celic zmanjšala za 50 % (IC50). Če se ugotovi citotoksičnost, je treba tako razpon koncentracij kakor razmak med posameznimi koncentracijami izbrati tako, da je poskusne podatke mogoče prikazati v obliki krivulje.

Pri jasno pozitivnih in jasno negativnih rezultatih (glej oddelek 2.3, prvi odstavek) je dovolj glavni poskus, podprt z enim ali več predhodnimi poskusi za ugotavljanje razpona.

▼B

Dvoumne, mejne ali nejasne rezultate je treba pojasniti z dodatnim preskušanjem (glej tudi oddelek 2.4, drugi odstavek). V teh primerih je treba preučiti spremembo pogojev preskusa. Pogoji preskusa, ki se lahko spremenijo, so med drugim območje ali razmak koncentracij, trajanje predinkubacije in trajanje izpostavljenosti obsevanju. Za kemikalije, ki so v vodi nestabilne, je lahko ustrezen krajši čas izpostavljanja.

2.2 OCENA REZULTATOV

Za vrednotenje podatkov se lahko izračunata faktor fotoiritacije (PIF) in srednji fotoučinek (MPE).

Za izračun mer fotocitotoksičnosti (glej spodaj) je treba določiti ustrezno neprekinjeno krivuljo koncentracija-reakcija (model), ki se približa naboru diskretnih vrednosti koncentracije-reakcije. Prirejanje krivulje podatkom se običajno opravi z metodo nelinearne regresije (18). Za vrednotenje vpliva variabilnosti podatkov na prirejeno krivuljo se priporoča postopek bootstrap.

Faktor fotoiritacije (PIF) se izračuna po naslednji enačbi:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Če IC_{50} v prisotnosti ali odsotnosti svetlobe ni mogoče izračunati, se PIF za preskušani material ne da določiti. Srednji fotoučinek (MPE) temelji na primerjavi celotnih krivulj koncentracija-reakcija (19). Opredeljen je kot tehtano povprečje preko reprezentativnega nabora vrednosti fotoučinka.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Fotoučinek PEc pri kateri koli koncentraciji C je definiran kot zmnožek učinka reakcije REc in učinka odmerka DEc, tj. PEc = REc × DEc. Učinek reakcije REc je razlika med reakcijama, zabeleženima v odsotnosti in prisotnosti svetlobe, tj. REc = Rc (- Irr) – Rc (+ Irr). Učinek odmerka se izračuna po naslednji enačbi:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

pri čemer je C* enakovredna koncentracija, tj. koncentracija, pri kateri je reakcija + Irr enakovredna reakciji - Irr s koncentracijo C. Če C* ni možno določiti, ker so vrednosti reakcij krivulje +Irr sistematično višje ali nižje od Rc(- Irr), se učinek odmerka določi na 1. Utežni faktorji wi so določeni z najvišjo vrednostjo reakcije, tj. wi = MAX {Ri (+ Irr), Ri (- Irr)}. Koncentracijska mreža C; se izbere tako, da enako število točk pade v vsak koncentracijski interval, ki je definiran s koncentracijami, uporabljenimi v preskusu. Izračun MPE je omejen na najvišjo vrednost koncentracije, pri kateri vsaj ena od krivulj kaže vrednost reakcije najmanj 10 %. Če je ta najvišja koncentracija višja od najvišje koncentracije, uporabljene v poskusu + Irr, se preostanek krivulje + Irr določi na vrednost reakcije „0“. Kemikalija se uvrsti med fototoksične snovi, glede na to, ali je vrednost MPE večja od ustrezno izbrane vrednosti praga (MPEc = 0,15) ali ne.

▼B

Programska oprema za izračun PIF in MPE je na voljo na (20).

2.3 RAZLAGA REZULTATOV

Na podlagi validacijske študije (8) preskušana snov s PIF < 2 ali MPE < 0,1 napoveduje: „brez fototoksičnosti“. PIF > 2 in < 5 ali MPE > 0,1 in < 0,15 napoveduje: „verjetna fototoksičnost“; in PIF > 5 ali MPE > 0,15 napoveduje: „fototoksičnost“.

V vsakem laboratoriju, kjer se uvaja ta preskus, je treba pred preskušanjem preskušanih snovi za fototoksično vrednotenje preskusiti referenčne materiale, navedene v tabeli 1. Vrednosti PIF ali MPE morajo biti blizu vrednostim iz tabele 1.

Tabela 1

Kemijsko ime	St Einecs	St CAS	PIF	MPE	Absorpcij ska konica	Topilo (1)
Amiodaron HCl	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (plato)	etanol
Kloropromazin HCl	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33–0,63	309 nm	etanol
Norfloksacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitril
Antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfirin IX, dinatrijev	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanol
L-Histidin		[7006-35-1]	brez PIF	0,05–0,10	211 nm	voda
Heksaklorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (plato)	etanol
Natrijev lavril sulfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	brez absorp-cije	voda

(1) Topilo za merjenje absorpcije.

2.4 RAZLAGA PODATKOV

Če so fototoksični učinki opaženi le pri najvišji preskusni koncentraciji (zlasti pri vodotopnih preskušanih kemikalijah), je morda potreben nadaljnji razmislek o oceni nevarnosti. Ta lahko zajema podatke o kožni absorpciji in akumulaciji kemikalije v koži in/ali podatke drugih preskusov, denimo pri preskusu kemikalije z modelom živalske ali človeške kože ali modeli kože *in vitro*.

▼B

Če pa toksičnost ni bila ugotovljena (+ Irr in - Irr) in če je topnost v vodi omejila preskusne koncentracije, je združljivost preskušane snovi s preskusom vprašljiva, tako da je treba razmisliti o potrjevalnem preskusu, npr. z drugim modelom.

3. **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati vsaj naslednje informacije:

Preskusna snov:

— identifikacijski podatki, skupna generična imena in IUPAC ter št. CAS, če so znana,

— agregatno stanje in čistost,

— fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije,

— absorpcijski spekter UV/vidna svetloba

— stabilnost in fotostabilnost, če sta znani.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila,

— topnost preskušane kemikalije v topilu,

— odstotek topila v obdelovalnem gojišču.

Celice:

— vrsta in izvor celic,

— odsotnost mikoplazem,

— število celičnih pasaž, če je znano,

— občutljivost celic za sevanje, določena z obsevalno opremo, ki se uporablja pri preskusu fototoksičnosti 3T3 NRU *in vitro.*

Preskusni pogoji (1); *inkubacijapred obdelavo in po njej:*

— vrsta in sestava umetnega gojišča,

— pogoji inkubacije (koncentracija CO_2; temperatura; vlažnost),

— trajanje inkubacije (predhodna obdelava, naknadna obdelava).

Preskusni pogoji (2); *obdelava s kemikalijo:*

— utemeljitev izbire koncentracij preskušane kemikalije, uporabljenih v prisotnosti in v odsotnosti obsevanja,

— pri omejeni topnosti preskušane kemikalije in odsotnosti citotoksičnosti: utemeljitev najvišje preskušane koncentracije,

— vrsta in sestava obdelovalnega gojišča (pufrska raztopina soli),

— trajanje kemičnega obdelovanja.

Preskusni pogoji (3); *obsevanje:*

— utemeljitev izbora uporabljenega vira svetlobe,

▼B

— izdelovalec in vrsta vira svetlobe ter radiometra,

— spektralne značilnosti sevanja vira svetlobe,

— značilnosti prepuščanja in absorpcije uporabljenega(-ih) filtra(-ov),

— značilnosti radio etra in podatki o njegovi kalibraciji,

— oddaljenost vira svetlobe od preskusnega sistema,

— UVA-obsevanje s te razdalje, izraženo v mW/cm^2,

— trajanje izpostavljenosti UV/vidni svetlobi,

— odmerek UVA (obsevanje × čas), izražen v J/cm^2,

— temperatura celičnih kultur med obsevanjem in celičnih kultur, ki so bile istočasno v temi.

Preskusni pogoji (4); *Preskus viabilnosti z nevtralno rdečim:*

— sestava gojišča za obdelovanje z nevtralno rdečim,

— trajanje inkubacij e nevtralno rdečega,

— pogoji inkubacije (koncentracija CO_2; temperatura; vlažnost),

— pogoji ekstrakcije nevtralno rdečega (ekstrakcijsko sredstvo, trajanje),

— valovna dolžina, uporabljena za spektrofotometrično merjenje optične gostote nevtralno rdečega,

— druga valovna dolžina (referenca), če je bila uporabljena,

— vsebina spektrofotometričnega slepega vzorca, če je bil uporabljen.

Rezultati:

— viabilnost celic, pridobljena pri vsaki posamezni koncentraciji preskušane kemikalije, izražena kot odstotek viabilnosti povprečne vrednosti hkratnih kontrol s topilom,

— krivulje koncentracija-reakcija (koncentracija preskušane kemikalije proti relativni viabilnosti celic), pridobljene v hkratnih poskusih + Irr in - Irr,

— analiza krivulj koncentracij a-reakcij a: če je mogoče, navedba/izračun IC_{50} (+ Irr) in IC_{50} (- Irr),

— primerjava dveh krivulj koncentracij a-reakcij a, pridobljenih v prisotnosti in odsotnosti obsevanja, in sicer bodisi z izračunom faktorja fotoiritacije (PIF) ali z izračunom srednjega fotoučinka (MPE),

— merila za sprejemljivost preskusa; hkratna kontrola s topilom,

— absolutna viabilnost (optična gostota ekstrakta nevtralno rdečega) obsevanih in neobsevanih celic,

— historični podatki o negativnih kontrolah in kontrolah s topilom, srednje vrednosti in standardni odkloni,

— merila za sprejemljivost preskusa; hkratna pozitivna kontrola,

▼B

— IC_{50} (+ Irr) in IC_{50} (- Irr) ter PIF/MPE kemikalije za pozitivno kontrolo,

— historični podatki o kemikaliji za pozitivno kontrolo: IC_{50} (+ Irr) and IC_{50} (- Irr) ter PIF/MPE; srednje vrednosti in standardni odkloni.

Razprava o rezultatih.

Sklepi.

4. **LITERATURA**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam, p XI–XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Holzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22. 314–348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79–110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Doring, B., Holzhiitter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G De Silva, O., Holzhutter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th – 31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhutter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhutter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

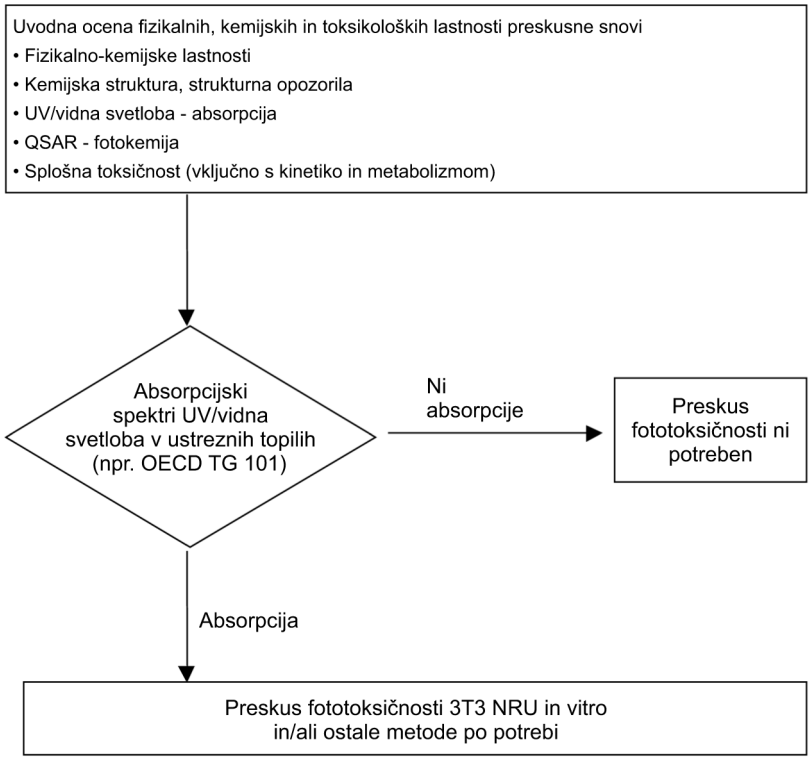
19. Holzhiitter, H.G. (1997). A general measure of in *vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in *vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_ 2349687_1_1_1_1,00. html

▼B

Dodatek 1

Vloga 3T3 NRU PT v postopnem pristopu k preskušanju fototoksičnosti kemikalij

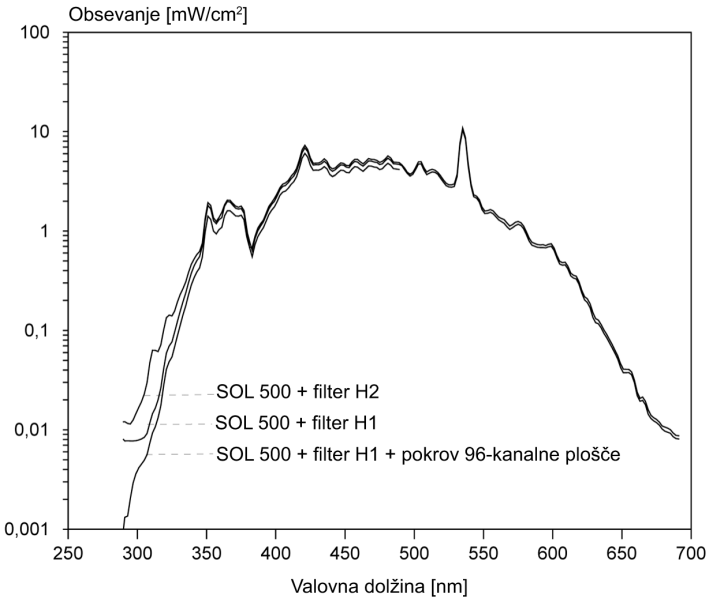


▼B

Dodatek 2

Slika 1

Spektralna porazdelitev moči pri filtriranem solarnem simulatorju



(glej oddelek 1.4.1.5, drugi odstavek)

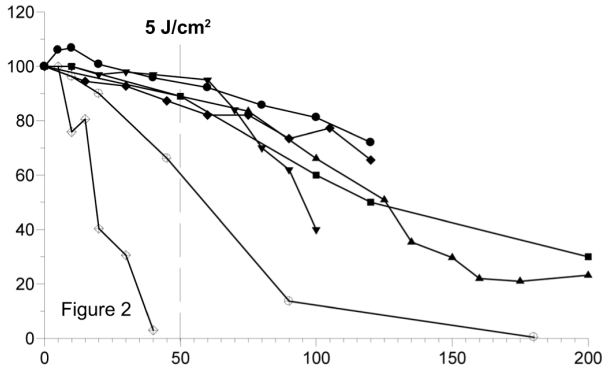
V sliki 1 je prikazan primer sprejemljive spektralna porazdelitev obsevanja pri filtriranem solarnem simulatorju. Uporabljena je bila dopirana kovinska halogenidna svetilka, kakor v preskusu 3T3 NRU PT (6) (8) (17). Prikazan je učinek dveh različnih filtrov in učinka dodatnega filtriranja pokrova 96-kanalne plošče za celične kulture. Filter H2 se je uporabil le v preskusnih sistemih, ki lahko prenašajo večje količine UVB (preskus z modelom kože in preskus fotohemolize eritrocitov). Pri 3T3 NRU-PT je bil uporabljen filter H1. V sliki je prikazano, da se učinek dodatnega filtriranja pokrova plošče pojavlja predvsem v območju UVB, pri čemer v obsevalnem spektru ostaja dovolj UVB zavzbujanje kemikalij, ki se običajno absorbirajo v območje UVB, npr. amiodaron (glej tabelo 1).

▼B

Slika 2

Občutljivost celic Balb/c 3T3 za sevanje (izmerjeno v območju UVA)

Viabilnost celic (% sprejemanja nevtralno rdečega pri kontrolah v temi)



(glej oddelek 1.4.1.5.2, drugi odstavek; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Občutljivost celic Balb/c 3T3 za obsevanje z uporabljenim solarnim simulatorjem v validacijskem preskušanju preskusa fototoksičnosti 3T3 NRU, izmerjena v območju UVA. V sliki so prikazani rezultati sedmih različnih laboratorijev v predvalidacijski študiji (1). Krivulji z odprtimi točkami izvirajo iz starejših celic (večje število pasaž), ki so jih morale zamenjati nove zaloge celic, katerih rezultati so prikazane s krivuljami s krepkimi točkami, ki predstavljajo sprejemljivo toleranco na obsevanje.

Iz teh podatkov je pridobljen največji necitotoksični odmerek obsevanja 5 J/cm^2 (navpična črtkana črta). Vodoravna črtkana črta prikazuje največji sprejemljiv učinek obsevanja, ki je opisan v odstavku 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK**

UVOD

1. Smernice OECD za preskušanje kemikalij in preskusne metode EU, ki temeljijo na teh smernicah, se redno preverjajo zaradi znanstvenega napredka, spreminjajočih se zakonodajnih potreb in vprašanj, povezanih z dobrim počutjem živali. Prvotna preskusna metoda za določanje preobčutljivosti kože pri miših, lokalna analiza bezgavk (LLNA; Smernica za preskušanje OECD 429; poglavje B.42 te priloge) je bila sprejeta že prej (1). Objavljene so podrobnosti o validaciji LLNA in pregled s tem povezanega dela (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Posodobljena LLNA temelji na oceni izkušenj in znanstvenih podatkih (12). To je druga preskusna metoda, zasnovana za ocenjevanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami (snovmi in zmesmi) pri živalih. Druga preskusna metoda (tj. Smernica za preskušanje OECD 406; poglavje B.6 te priloge) pa uporablja preskuse na morskih prašičkih, predvsem maksimizacijski in Buehlerjev preskus na morskih prašičkih (13). LLNA zagotavlja prednosti v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 (13) glede dobrega počutja živali. Ta posodobljena preskusna metoda za LLNA vključuje skupino standardov učinkovitosti (Dodatek 1), ki se lahko uporabijo za oceno statusa validacije novih in/ali spremenjenih preskusnih metod, ki so v fukcijskem in mehaničnem smislu podobne LLNA, v skladu z načeli smernic OECD št. 34 (14).

2. LLNA preučuje indukcijsko fazo preobčutljivosti kože in zagotavlja količinske podatke, ki so primerni za oceno odziva na odmerek. Treba je opozoriti, da so blagi/zmerni povzročitelji preobčutljivosti, ki se priporočajo kot ustrezne kemikalije pozitivne kontrole za preskusne metode z morskimi prašički (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406), (13) primerni tudi za uporabo pri LLNA (6) (8) (15). Pristop omejene LLNA (rLLNA), pri katerem bi se lahko uporabilo do 40 % manj živali, je prav tako opisan kot možnost v tej preskusni metodi (16) (17) (18). rLLNA se lahko uporabi, kadar obstaja zakonodajna potreba po potrditvi negativne napovedi o morebitni preobčutljivosti kože, če so izpolnjene vse druge specifikacije protokola LLNA, kot je opisano v tej preskusni metodi. Napoved negativnega rezultata bi morala temeljiti na vseh razpoložljivih informacijah, kot je opisano v odstavku 4. Pred uporabo rLLNA je treba zagotoviti jasne obrazložitve in znanstvene utemeljitve za njeno uporabo. Če je z rLLNA proti pričakovanjem pridobljen pozitiven ali dvoumen rezultat, je morda potrebno dodatno preskušanje za razlago ali pojasnitev izidov. rLLNA se ne sme uporabljati za ugotavljanje nevarnosti preskusnih snovi, ki povzročajo preobčutljivost kože, kadar so potrebne informacije o odzivu na odmerek, kot npr. podrazvrsititev za Uredbo (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi in Globalno usklajen sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij Združenih narodov.

OPREDELITVE POJMOV

3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.

IZHODIŠČA IN OMEJITVE

4. LLNA je nadomestna metoda za ugotavljanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami. To ne pomeni nujno, da je treba v vseh primerih namesto preskusov na morskih prašičkih uporabiti LLNA (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13), temveč da je ta analiza enako dobra in se lahko uporabi kot druga možnost, pri kateri navadno niso več potrebne dodatne potrditve pozitivnih in negativnih rezultatov. Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom študije preučiti vse razpoložljive informacije o

▼M3

preskusni snovi. Takšne informacije bodo vključevale vrsto in kemijsko sestavo preskusne snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na preskusni snovi, *in vitro* ali *in vivo*; in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. Te informacije je treba preučiti, da se določi, ali je LLNA primerna za snov (glede na nezdružljivost omejenega števila vrst kemikalij pri LLNA – glej odstavek 5), in za lažjo izbiro odmerka.

5. LLNA je metoda *in vivo* in posledično ne odpravlja uporabe živali pri ocenjevanju delovanja, ki povzročajo alergijsko preobčutljivost ob stiku. Vendar ima možnost, da zmanjša število živali, potrebnih v ta namen. Še več, LLNA ponuja znatno izboljšanje (manj bolečine in trpljenja) načina, kako se živali uporabljajo za preskušanje alergijske preobčutljivosti ob stiku. LLNA temelji na upoštevanju imunoloških primerov, ki jih spodbudijo kemikalije med indukcijsko fazo preobčutljivosti. V nasprotju s preskusi na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD (406) (13) LLNA ne zahteva, da se povzročijo izzvane reakcije prekomerne občutljivosti kože. Poleg tega LLNA ne zahteva uporabe pomožnega preskusa (13) kot pri maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih S tem LLNA zmanjšuje bolečino in trpljenje živali. Kljub prednostim LLNA v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 je treba upoštevati, da obstajajo nekatere omejitve, zaradi katerih je lahko nujna uporaba metode B.6 ali Smernice za preskušanje OECD 406 (13) (*npr.* lažni negativni izidi pri LLNA pri nekaterih kovinah, lažni pozitivni izidi pri nekaterih dražilnih snoveh za kožo [kot so nekatere vrste površinsko razgradljivih kemikalij] (19) (20), ali topnost preskusne snovi). Poleg tega je zaradi kemijskih razredov ali snovi s funkcionalnimi skupinami, za katere se je izkazalo, da lahko delujejo kot moteči dejavniki (21) lahko potrebna uporaba preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13). Na podlagi omejene podatkovne zbirke za validacijo, ki je obsegala zlasti pesticidne pripravke, je bolj verjetno, da bo za te vrste snovi pozitiven rezultat prinesla LLNA kot pa preskus na morskih prašičkih (22). Vendar pa bi se lahko pri preskušanju pripravkov preučila tudi možnost vključitve podobnih snovi z znanimi rezultati kot primerjalnih snovi, s čimer bi se dokazalo, da LLNA deluje pravilno (glej odstavek 16). Razen takšnih opredeljenih omejitev bi morala biti LLNA primerna za preskušanje katere koli snovi, razen če so s temi snovmi povezane lastnosti, ki lahko ovirajo natančnost LLNA.

NAČELO PRESKUSA

6. Osnovno načelo, na katerem temelji LLNA, je, da povzročitelji preobčutljivosti povzročijo množenje limfocitov v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi. To množenje je sorazmerno z odmerkom in močjo uporabljenega alergena in je preprosto sredstvo za pridobitev količinske izmere preobčutljivosti. Množenje se izmeri s primerjavo povprečnega množenja v vsaki preskusni skupini in povprečnega množenja v kontrolni skupini, tretirani z nosilcem. Preden se utemelji razvrstitev preskusne snovi kot možnega povzročitelja preobčutljivosti kože, se določi razmerje med povprečnim množenjem v vsaki tretirani skupini in povprečnim množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem, ki se imenuje stimulacijski indeks (SI) in mora biti ≥ 3. Tukaj opisani postopki temeljijo na uporabi *in vivo* radioaktivnih oznak za merjenje povečanega števila množečih se celic v ušesnih bezgavkah. Za oceno števila množečih se celic se lahko uporabijo tudi druge končne točke, če so zahteve standardov učinkovitosti v celoti izpolnjene (Dodatek 1).

▼M3

OPIS ANALIZE

Izbira živalskih vrst

7. Izbrana vrsta za ta preskus je miš. Uporabijo se mlade odrasle mišje samice seva CBA/Ca ali CBA/J, ki še niso kotile in niso breje. Na začetku študije morajo biti živali stare 8–12 tednov, odstopanje mase živali pa mora biti čim manjše in ne sme presegati 20 % povprečne mase. Namesto tega se lahko uporabijo drugi sevi in samci, če je pridobljenih dovolj podatkov za dokaz, da ne obstajajo značilne razlike v odzivu pri LLNA glede na sev in/ali spol.

Bivalni in prehranjevalni pogoji

8. Miši morajo biti skupinsko nastanjene (23), razen če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev za njihovo ločeno nastanitev. Temperatura v prostoru za poskusne živali mora biti 22 ± 3 °C. Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme, razen med čiščenjem prostora, presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, 50–60 %. Osvetlitev mora biti umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Priprava živali

9. Živali se naključno izberejo, označijo tako, da je omogočeno posamično prepoznavanje (vendar ne s katero od oblik ušesnih oznak), in zadržijo v kletkah najmanj pet dni pred začetkom dajanja odmerka, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram. Pred začetkom tretiranja se vse živali pregledajo, da se zagotovi, da nimajo opaznih kožnih lezij.

Priprava preskusnih raztopin

10. Trdne kemikalije se pred nanosom na uho miši raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko nanesejo nerazredčene ali pa se razredčijo pred dajanjem odmerka Pri netopnih kemikalijah, kot so tiste, ki se običajno uporabljajo v medicinskih pripomočkih, je treba uporabiti močno povečano ekstrakcijo v ustreznem topilu, da se odkrijejo vse ekstraktibilne sestavine za preskušanje pred nanosom na uho miši. Preskusne snovi je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preverjanje zanesljivosti

11. Za prikaz ustrezne učinkovitosti analize se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki se odzovejo z ustrezno in ponovljivo občutljivostjo kot preskusna snov, ki povzroča preobčutljivost, za katero je stopnja reakcije natančno opredeljena. Uporaba primerjalne pozitivne kontrole je priporočena, saj pokaže zmožnost laboratorija, da uspešno izvede vsako analizo, ter omogoča ocenjevanje ponovljivosti in primerljivosti v enem ali več laboratorijih. Tudi nekateri regulativni organi zahtevajo uporabo pozitivne kontrole pri vsaki raziskavi, zato se uporabnikom priporoča, da se pred izvedbo LLNA posvetujejo s pristojnimi organi. V skladu s tem se priporoča redna uporaba primerjalne pozitivne kontrole, saj tako ni potrebno dodatno preskušanje na živalih za izpolnitev zahtev, ki se lahko pojavijo zaradi uporabe redne pozitivne kontrole (glej odstavek 12). Pozitivna kontrola mora povzročiti pozitiven odziv LLNA na raven izpostavljenosti, za katero se pričakuje, da bo dala večji stimulacijski indeks (SI) > 3 kot negativna kontrolna skupina. Odmerek pozitivne kontrole je treba izbrati

▼M3

tako, da ne povzroči čezmernega draženja kože ali sistemske toksičnosti in da je indukcija ponovljiva, vendar ne čezmerna (tj. SI > 20 bi bil čezmeren) Priporočena pozitivna kontrola je 25-odstotni heksil cimetov aldehid (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov [CAS] št. 101-86-0) v acetonu: olivno olje (4:1, v/v) in 5-odstotni merkaptobenzotiazol (št. CAS 149-30-4) v *N,N*-dimetilformamidu (glej Dodatek 1, preglednica 1). V nekaterih okoliščinah se lahko ob ustrezni utemeljitvi uporabijo druge pozitivne kontrole, ki izpolnjujejo zgornja merila.

12. Običajno je uporaba primerjalne pozitivne kontrolne skupine priporočena, lahko pa obstajajo okoliščine, v katerih redno preskušanje (tj. v razmikih ≤ 6 mesecev) pozitivne kontrole morda zadošča za laboratorije, ki redno izvajajo LLNA (tj. izvajajo LLNA vsaj enkrat mesečno) in imajo vzpostavljene zbirke podatkov o preteklih pozitivnih kontrolah, ki dokazujejo zmožnost laboratorija, da pridobi ponovljive in natančne rezultate s pozitivnimi kontrolami. Ustrezna strokovnost pri izvajanju LLNA se lahko uspešno dokaže z dobivanjem doslednih pozitivnih rezultatov pri pozitivni kontroli pri vsaj desetih neodvisnih preskusih, izvedenih v razumnem časovnem obdobju (tj. v manj kot enem letu).

13. Primerjalno pozitivno kontrolno skupino je treba vključiti vedno, kadar pride do postopkovne spremembe pri LLNA (tj. zamenjava usposobljenega osebja, zamenjava materiala za preskusno metodo in/ali reagentov, zamenjava opreme za preskusno metodo, zamenjava vira preskusnih živali), takšne spremembe pa je treba vedno zabeležiti v laboratorijskih poročilih. Pri odločanju o nujnosti vzpostavitve nove zbirke preteklih podatkov za beleženje doslednosti pri rezultatih pozitivne kontrole je treba upoštevati učinek, ki ga imajo te spremembe na ustreznost predhodno vzpostavljene zbirke preteklih podatkov.

14. Raziskovalci se morajo zavedati, da odločitev o izvajanju redne namesto primerjalne pozitivne kontrolne študije vpliva na ustreznost in sprejemljivost negativnih rezultatov študije, pridobljenih brez primerjalne pozitivne kontrole v razmiku med rednimi pozitivnimi kontrolnimi študijami. Na primer, če je rezultat, pridobljen z redno pozitivno kontrolno študijo, lažno negativen, so lahko vprašljivi negativni rezultati preskusne snovi, pridobljeni v času med zadnjo sprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo in nesprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo. Pri odločanju, ali vključiti primerjalne pozitivne kontrole ali izvajati samo redne pozitivne kontrole, je treba skrbno preučiti posledice teh rezultatov. Treba je razmisliti tudi o uporabi manjšega števila živali v primerjalni pozitivni kontrolni skupini, če je to znanstveno utemeljeno in če laboratorij na podlagi preteklih podatkov, značilnih za laboratorij, dokaže, da se lahko uporabi manjše število miši (12).

15. Čeprav je treba pozitivno kontrolo preskusiti v nosilcu, za katerega je znano, da povzroča dosleden odziv (npr. aceton: olivno olje; 4:1, v/v), lahko obstajajo nekatere zakonodajne okoliščine, ko je potrebno tudi preskušanje v nestandardnem nosilcu (klinično/kemično ustrezne sestave) (24). Če se primerjalna pozitivna kontrola preskuša v drugem nosilcu kot preskusna snov, je treba za primerjalno pozitivno kontrolo vključiti ločen kontrolni nosilec.

16. V primerih, kjer se ocenjujejo preskusne snovi za poseben kemijski razred ali razpon reakcij, so lahko primerjalne snovi uporabne tudi za dokaz, da preskusna metoda deluje pravilno za odkrivanje morebitne preobčutljivosti kože pri teh vrstah preskusnih snovi. Ustrezne primerjalne snovi morajo imeti naslednje lastnosti:

— strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskusne snovi, ki se preskuša,

— znane fizikalne/kemijske lastnosti,

— podporne podatke iz LLNA,

— podporne podatke od drugih živalskih modelov in/ali ljudi.

▼M3

PRESKUSNI POSTOPEK

Število živali in velikost odmerkov

17. Na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali z najmanj tremi koncentracijami preskusne snovi, poleg tega pa še primerjalna negativna kontrolna skupina, tretirana zgolj z nosilcem za preskusno snov, in pozitivna kontrola (primerjalna ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15). Treba je razmisliti o preskušanju več odmerkov pozitivne kontrole, zlasti če se pozitivna kontrola preskuša občasno. Živali v kontrolnih skupinah je treba, razen če se ne tretirajo s preskusno snovjo, obravnavati in tretirati na enak način kot živali v tretiranih skupinah.

18. Izbira odmerka in nosilca mora temeljiti na priporočilih iz sklica (3) in (5). Zaporedni odmerki se običajno izberejo iz ustrezne serije koncentracij, kot so 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Izbira uporabljene serije koncentracij mora biti ustrezno znanstveno utemeljena. Kadar so na voljo, je treba pri izbiri treh zaporednih koncentracij upoštevati vse obstoječe toksikološke informacije (npr. akutno toksičnost in draženje kože) ter strukturne in fizikalno-kemijske informacije o želeni preskusni snovi (in/ali strukturno povezani snovi), tako da je pri največji koncentraciji izpostavljenost največja, hkrati pa ni sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (3) (25). Če takšne informacije niso na voljo, je morda najprej potreben predhodni presejalni preskus (glej odstavke 21–24).

19. Nosilec ne sme ovirati rezultatov preskusa ali vplivati nanje, izbere pa se na podlagi povečevanja topnosti, da se med pripravljanjem raztopine/suspenzije, ki je primerna za uporabo preskusne snov, pridobi največjo možno koncentracijo. Priporočljivi nosilci so aceton: olivno olje (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol in dimetil sulfoksid (19), vendar se lahko uporabljajo tudi drugi, če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev. V nekaterih okoliščinah je morda treba kot dodatno kontrolo uporabiti klinično ustrezno topilo ali trgovsko sestavo, v kateri se trži preskusna snov. Paziti je treba zlasti, da so v nosilni sistem vključene hidrofilne preskusne snovi, ki vlažijo kožo in se ne izsušijo takoj, z vključitvijo ustreznih pospeševalcev raztapljanja (npr. 1-odstotnim Pluronic® L92). Zato se je treba izogibati povsem vodnim nosilcem.

20. Obdelava bezgavk posamezne miši omogoča oceno spremenljivosti med posameznimi živalmi ter statistično primerjavo razlik med meritvami preskusne snovi in primerjalne kontrolne skupine z nosilcem (glej odstavek 35). Poleg tega je ocena možnosti zmanjšanja števila miši v pozitivni kontrolni skupini izvedljiva samo, če se zbirajo podatki o posameznih živalih (12) spodaj. Poleg tega nekateri regulativni organi zahtevajo zbiranje podatkov o posameznih živalih. Kljub temu lahko nekateri regulativni organi skupne podatke o živalih štejejo za sprejemljive; v takih primerih imajo lahko uporabniki možnost, da zbirajo podatke o posameznih živalih ali skupne podatke.

Predhodni presejalni preskus

21. Če informacije za določitev največjega odmerka za preskušanje niso na voljo (glej odstavek 18 zgoraj), je treba izvesti predhodni presejalni preskus, da se določi ustrezna velikost odmerka za preskušanje z LLNA. Namen predhodnega presejalnega preskusa je zagotoviti smernice za izbiro največje velikosti odmerka za uporabo v glavni študiji LLNA v primerih, ko niso na voljo informacije o koncentraciji, ki povzroči sistemsko toksičnost (glej odstavek 24) in/ali čezmerno draženje kože (glej odstavek 23). Največja velikost odmerka je 100-odstotna preskusna snov za tekočine ali najvišja možna koncentracija za trdne snovi ali suspenzije.

▼M3

22. Predhodni presejalni preskus se izvede v pogojih, ki so enaki tistim v glavni študiji LLNA, s to razliko, da se ne izvede ocena množenja v bezgavkah in da se lahko uporabi manj živali na skupino odmerka. Predlaga se uporaba ene ali dveh živali na skupino odmerka. Vse miši se opazuje dnevno glede kliničnih znakov sistemske toksičnosti ali lokalnega draženja na mestu nanosa. Telesna masa se zabeleži pred preskusom in pred usmrtitvijo (6. dan). Obe ušesi vsake miši se opazuje glede rdečine in oceni s pomočjo preglednice 1 (25). Meritve debeline ušesa se izvedejo z napravo za merjenje debeline (npr. digitalnim mikrometrom ali merilnikom debeline s številčnico) 1. dan (pred odmerkom), 3. dan (približno 48 ur pred prvim odmerkom) in 6. dan. Poleg tega se lahko 6. dan debelino ušesa določi s preluknjanjem ušes za določitev mase, ki se izvede po humani usmrtitvi živali. Znak za čezmerno draženje kože je rdečina z oceno ≥ 3 in/ali povečana debelina ušesa za ≥ 25 % na kateri koli dan merjenja (26) (27). Največji odmerek, izbran za glavno študijo LLNA, je naslednji nižji odmerek v seriji koncentracij iz predhodnega presejalnega preskusa (glej odstavek 18), ki ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože.

Preglednica 1

Ocena rdečine

Ugotovitev	Ocena
Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2
Zmerna do močna rdečina	3
Močna rdečina (rdečina rdeče pese) in nastanek krast ovirata razvrstitev rdečine	4

23. Poleg 25-odstotnega povečanja debeline ušesa (26) (27) se za opredelitev dražilnih snovi pri LLNA uporablja tudi statistično značilno povečanje debeline ušesa tretirane miši v primerjavi s kontrolno mišjo (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ker pa se lahko statistično značilno povečanje pojavi tudi pri debelini ušesa, manjši od 25 %, ni izrecno povezano s čezmernim draženjem (30) (32) (33) (34).

24. Naslednje klinične ugotovitve lahko nakazujejo sistemsko toksičnost (35) (36), kadar se uporabljajo kot del celovite ocene, in zato lahko pokažejo največjo velikost odmerka za uporabo v glavni LLNA: spremembe v delovanju živčnega sistema (npr. piloerekcija, ataksija, tremorji in krči); vedenjske spremembe (npr. agresivnost, spremembe glede nege, opazna sprememba stopnje aktivnosti); spremembe dihanja (npr. spremembe frekvence in intenzivnosti dihanja, kot so dispneja, zasoplost in hropenje) ter spremembe glede uživanja hrane in vode. Poleg tega je treba pri oceni upoštevati znake letargije in/ali neodzivnosti ter morebitne klinične znake bolečine in trpljenja, ki niso samo blagi ali trenutni, ali zmanjšanje telesne mase za > 5 % od 1. do 6. dne ter smrtnost. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo ali kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtijo na human način (37).

▼M3

Načrt za poskus glavne študije

25. Načrt za poskus analize je naslednji:

— *1. dan:* Posamično ugotovljena in zabeležena masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Nanos 25 µl ustrezno razredčene preskusne snovi, samega nosilca ali pozitivne kontrole (primerjalne ali izvedene pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15).

— *2. in 3. dan:* Ponovi se postopek nanosa, ki je bil izveden 1. dan.

— *4. in 5. dan:* Brez tretiranja.

— *6. dan:* Zabeleži se masa vsake živali. Vsem poskusnim in kontrolnim mišim se v repno žilo vbrizga 250 µl sterilnega fosfatnega pufra s soljo (PBS), ki vsebuje 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritiranega (^{3}H)-metil timidina. Lahko pa se vsem mišim v repno veno vbrizga 250 µL PBS, ki vsebuje 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jododeoksiuridina in 10^{-5} M fluorodeoksiuridina. Pet (5) ur kasneje so živali humano usmrčene. Ušesne bezgavke ob vsakem ušesu miši se izrežejo in shranijo v PBS za vsako žival (pristop po posamezni živali); lahko pa se bezgavke iz vsakega ušesa izrežejo in shranijo v PBS za vsako tretirano skupino (zbirni pristop za tretirane skupine). Podatki in diagrami o identifikaciji in izrezu bezgavk so na voljo v sklicu (12). Za nadaljnje spremljanje lokalnega odziva kože v glavni študiji se lahko v protokol študije vključijo dodatni parametri, kot so ocena rdečine ušesa ali meritve debeline ušesa (pridobljene z merilnikom debeline ali preluknjanjem ušes za določitev mase pri obdukciji).

Priprava celičnih suspenzij

26. Enotna celična suspenzija iz celic izrezanih bezgavk, bodisi bilateralno iz posameznih živali bodisi zbirno iz tretiranih skupin, se pripravi z blago mehanično disagregacijo skozi žično mrežo iz nerjavnega jekla z velikostjo odprtin 200 mikronov ali drugo uveljavljeno tehniko za pripravo enotne celične suspenzije. Celice iz bezgavk se dvakrat izperejo s presežkom fosfatnega pufra s soljo in DNA se 18 ur obarja s 5-odstotno triklorocetno kislino pri 4 °C (3). Peleti se ponovno suspendirajo v 1 ml triklorocetne kisline in prenesejo v scintilacijske stekleničke, ki vsebujejo 10 ml scintilacijske tekočine, za štetje 3H, ali pa prenesejo neposredno v epruvete za gama štetje za 1^{25}I.

Določitev množenja celic (vključena radioaktivnost)

27. Vključitev 3H-metil timidina se izmeri z β-scintilacijskim štetjem razgradenj na minuto (DPM). Vključitev 1^{25}I-jododeoksiuridina se izmeri s štetjem 1^{25}I in se prav tako izrazi kot DPM. Odvisno od uporabljenega pristopa se vključitev izrazi kot DPM/miš (posamični pristop) ali DPM/tretirano skupino (zbirni pristop za tretirane skupine).

Omejena LLNA

28. V določenih primerih, ko obstaja zakonodajna potreba po potrditvi negativne napovedi preobčutljivosti kože, se lahko uporabi neobvezni protokol rLLNA (16) (17) (18) z manjšim številom živali, če so izpolnjene vse druge specifikacije protokola rLLNA v tej preskusni metodi. Pred uporabo rLLNA je treba zagotoviti jasne obrazložitve in znanstvene utemeljitve za njeno uporabo. Če je pridobljen pozitiven ali dvoumen rezultat, je morda potrebno dodatno preskušanje za razlago ali pojasnitev izida.

▼M3

29. Edina razlika med protokoli preskusne metode LLNA in rLLNA je manjše število skupin odmerka, zaradi česar rLLNA ne zagotavlja informacij o odzivu na odmerek. Zato se, kadar so potrebne informacije o odzivu na odmerek, rLLNA ne uporablja. Tako kot pri LLNA z več odmerki mora biti koncentracija preskusne snovi, ki se ocenjuje pri rLLNA, najvišja koncentracija, ki pri miši ne povzroči očitne sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (glej odstavek 18).

OPAZOVANJA

Klinična opazovanja

30. Vsako miš je treba vsaj enkrat dnevno natančno opazovati glede kliničnih znakov, lokalnega draženja na mestu nanosa ali sistemske toksičnosti. Vsa opazovanja se sistematično zabeležijo v evidence, ki se vodijo za vsako miš. Načrti spremljanja morajo vključevati merila za hitro identifikacijo miši, ki izražajo sistemsko toksičnost, čezmerno draženje kože ali jedkost za kožo zaradi evtanazije (37).

Telesna masa

31. Kot je navedeno v odstavku 25, se telesna masa posameznih živali izmeri na začetku preskusa in ob predvideni humani usmrtitvi.

IZRAČUN REZULTATOV

32. Rezultati za vsako tretirano skupino so izraženi kot stimulacijski indeks (SI). Kadar se uporabi pristop po posamezni živali, se SI dobi tako, da se povprečno število razgradenj na minuto/miš v vsaki skupini preskusne snovi in v pozitivni kontrolni skupini deli s povprečnim številom razgradenj na minuto/miš za kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Povprečni SI za kontrolne skupine z nosilcem je potem 1. Kadar se uporabi zbirni pristop za tretirane skupine, se SI dobi tako, da se zbirna radioaktivna vključitev za vsako tretirano skupino z vključitvijo zbirne kontrolne skupine deli z nosilcem, kar da povprečni SI.

33. Pri postopku odločanja se rezultat šteje za pozitivnega, ko je SI $\geq$ 3. Vendar se lahko pri odločanju, ali je mejni rezultat pozitiven, uporabijo tudi moč odziva na odmerek, statistični pomen ter doslednost odzivov v topilu/nosilcu in pozitivni kontroli (4) (5) (6).

34. Če je treba razjasniti dobljene rezultate, je treba upoštevati različne lastnosti preskusne snovi, tudi strukturno podobnost z znanimi povzročitelji preobčutljivosti, če povzroča čezmerno lokalno draženje kože pri miši, in naravo opaženega odnosa med odmerkom in odzivom. Ti in drugi razlogi so podrobno obravnavani drugje (7).

35. Zbiranje podatkov o radioaktivnosti na ravni posamezne miši bo omogočilo statistično analizo prisotnosti in stopnje odnosa med odmerkom in odzivom v podatkih. Morebitna statistična ocena lahko vključuje oceno odnosa med odmerkom in odzivom ter ustrezno prilagojene primerjave preskusnih skupin (npr. skupina, ki je prejela odmerek v parih, proti primerjavam primerjalnih kontrolnih skupin z nosilcem). Statistična analiza lahko obsega npr. linearno regresijo ali Williamsov preskus za oceno nihanj odziva na odmerek in Dunnettov preskus za primerjave po parih. Pri izbiri ustrezne metode statistične analize se mora raziskovalec zavedati možnih neenakosti varianc in drugih sorodnih problemov, zaradi katerih je lahko nujna pretvorba podatkov ali neparametrska statistična analiza. V vsakem primeru bo moral raziskovalec morda izvesti izračune SI ter statistične analize s podatkovnimi točkami (včasih imenovanimi „izločitve“) in brez njih.

▼M3

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

36. Podatki se povzamejo v obliki preglednice. Pri uporabi pristopa po posamezni živali se prikažejo vrednosti DPM za posamezno žival, skupinsko povprečje DPM/žival, s tem povezane napake (npr. SD, SEM) in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino z nosilcem. Pri uporabi zbirnega pristopa za tretirane skupine se prikažeta povprečna/srednja DPM in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino z nosilcem.

Poročilo o preskusu

37. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

preskušane in kontrolne snovi:

— identifikacijske podatke (npr. številko CAS in številko EC, če je na voljo; vir; čistost; znane nečistoče, številko serije),

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. hlapnost, stabilnost, topnost),

— če je zmes, sestavo in relativne odstotke sestavin;

topilo/nosilec:

— identifikacijske podatke (čistost, po potrebi koncentracijo, uporabljeno količino),

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca;

preskusne živali:

— vir miši seva CBA,

— mikrobiološki status živali, če je znan,

— število in starost živali,

— vir živali, namestitvene pogoje, prehrano, itd.;

preskusni pogoji:

— podatke o pripravi in uporabi preskusne snovi,

— utemeljitev izbire odmerka (vključno z rezultati predhodnega presejalnega preskusa, če je bil izveden),

— uporabljene koncentracije nosilca in preskusne snovi ter skupno količino uporabljene preskusne snovi,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom prehranjevanja, virom vode),

— podatke o programih tretiranja in vzorčenja,

— metode merjenja toksičnosti,

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih ali negativnih,

— podrobnosti o morebitnih odstopanjih protokola in pojasnilo, kako odstopanje vpliva na zasnovo študije in njene rezultate;

preverjanje zanesljivosti:

— povzetek rezultatov zadnjega preverjanja zanesljivosti, vključno z informacijami o uporabljeni preskusni snovi, koncentraciji in nosilcu,

— primerjalne in/ali pretekle pozitivne in primerjalne negativne (topilo/nosilec) kontrolne podatke za preskuševalni laboratorij,

▼M3

— če primerjalna pozitivna kontrola ni bila vključena, datum in laboratorijsko poročilo nazadnje izvedene redne pozitivne kontrole in poročilo, ki navaja pretekle pozitivne kontrolne podatke za laboratorij, na podlagi katerih je upravičeno neizvajanje primerjalne pozitivne kontrole;

rezultati:

— posamezne mase živali na začetku odmerjanja in ob predvideni usmrtitvi; ter povprečno in povezano napako (npr. SD, SEM) za vsako tretirano skupino,

— časovni potek začetka toksičnosti in njenih znakov, vključno z morebitnim draženjem kože na mestu nanosa za vsako žival,

— preglednico z vrednostmi DPM za vsako posamezno miš (pristop po posamezni živali) ali povprečnimi/srednjimi (zbirni pristop za tretirane skupine) vrednostmi DPM in vrednostmi SI za vsako tretirano skupino,

— povprečno in povezano napako (npr. SD, SPM) za DPM/miš za vsako tretirano skupino in rezultate analize izločitev za vsako tretirano skupino pri uporabi pristopa po posamezni živali,

— izračunan SI in ustrezno merilo spremenljivosti, ki pri uporabi pristopa po posamezni živali upošteva spremenljivost med posameznimi živalmi tako v preskusni snovi kot kontrolnih skupinah,

— odnos med odmerkom in odzivom,

— po potrebi, statistične analize;

razprava o rezultatih:

— kratke pripombe o rezultatih, analizo odziva na odmerek in po potrebi statistične analize, s sklepom, ali naj se preskusna snov šteje za povzročitelja preobčutljivosti kože.

VIRI

1. OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

2. Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, Food Chem. Toxicol., 30, 165–169.

3. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, Toxicol., 93, 13–31.

4. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, J. Toxicol. Environ. Health, 53 563–79.

5. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

6. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

▼M3

8. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, Toxicol., 146, 49–59.

9. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34: 258–273.

10. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34, 274–286.

11. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34: 249–257.

12. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf.

13. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

14. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

15. Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, J. Appl. Toxicol., 18, 281–284.

16. Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? Contact Dermatitis, 54, 181–185.

17. ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Na voljo na spletni strani: http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf.

18. ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/.

19. ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf.

▼M3

20. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

21. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

22. ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/.

23. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

24. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

25. OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html.

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

27. ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, Toxicol. Meth., 8, 245–256.

31. Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

33. Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

35. OECD (1987), Acute Dermal Toxicity, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

▼**M3**

36. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

37. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

▼M3

Dodatek 1

Standardi učinkovitosti za ocenjevanje predlaganih podobnih ali prilagojenih preskusnih metod LLNA za preobčutljivost kože

UVOD

1. Namen standardov učinkovitosti je posredovati podlago, na kateri se lahko za nove preskusne metode, lastniške (tj. avtorske, zaščitene z blagovno znamko, registrirane) in nelastniške, ugotovi, da so ustrezno natančne in zanesljive za določene namene preskušanja. Ti standardi učinkovitosti, ki temeljijo na validiranih in uveljavljenih preskusnih metodah, se lahko uporabijo za oceno zanesljivosti in natančnosti drugih podobnih metod (ki se pogovorno imenujejo „podobni“ preskusi), ki temeljijo na podobnih znanstvenih načelih in merijo ali napovedujejo isti biološki ali toksični učinek (14).

2. Spremenjene metode (tj. predlagane morebitne izboljšave odobrene preskusne metode) je treba pred sprejetjem oceniti, da se ugotovita učinek predlaganih sprememb na učinkovitost preskusa in obseg, v katerem takšne spremembe vplivajo na informacije, ki so na voljo za druge elemente postopka validacije. Odvisno od števila in narave predlaganih sprememb, dobljenih podatkov in podporne dokumentacije za te spremembe se zanje izvede enak postopek validacije, kot je predpisan za nov preskus ali, po potrebi, omejena ocena zanesljivosti in ustreznosti z uveljavljenimi standardi učinkovitosti (14).

3. Podobne ali spremenjene metode, ki so predlagane za uporabo v okviru te preskusne metode, je treba oceniti ter določiti njihovo zanesljivost in natančnost z uporabo kemikalij, ki predstavljajo celoten razpon ocen LLNA. Da bi se izognili neupravičeni uporabi živali, se priporoča, da se razvijalci modelov pred začetkom izvajanja validacijskih študij v skladu s standardi učinkovitosti in smernicami iz te preskusne metode posvetujejo z ustreznimi organi.

4. Ti standardi učinkovitosti temeljijo na ameriških ICCVAM, evropskih ECVAM in japonskih JaCVAM usklajenih standardih učinkovitosti (12) za ocenjevanje veljavnosti podobnih ali spremenjenih različic LLNA. Standardi učinkovitosti obsegajo bistvene elemente preskusne metode, priporočene referenčne kemikalije ter standarde za natančnost in zanesljivost, ki jih mora predlagana metoda doseči ali preseči.

I. **Bistveni elementi preskusne metode**

5. Za zagotovitev, da je podobna ali spremenjena metoda LLNA v funkcijskem in mehaničnem smislu podobna LLNA in meri isti biološki učinek, morajo biti v protokol preskusne metode vključeni naslednji elementi:

— preskusna snov se površinsko nanese na obe ušesi miši,

— množenje limfocitov se izmeri v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi,

— množenje limfocitov se izmeri med indukcijsko fazo preobčutljivosti kože,

▼M3

— pri preskusnih snoveh je največji izbran odmerek najvišja koncentracija, ki pri miši ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože; pri pozitivnih referenčnih kemikalijah je največji odmerek vsaj tako velik kot vrednosti ocenjene koncentracije, potrebne za stimulacijski indeks 3 (vrednosti EC3) ustreznih referenčnih kemikalij (glej preglednico 1) pri LLNA, ne da bi pri miši povzročil sistemsko toksičnost in/ali čezmerno draženje kože,

— v vsako študijo je treba vključiti primerjalno kontrolno skupino z nosilcem, po potrebi pa se uporabi tudi primerjalna pozitivna kontrola,

— na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali,

— zberejo se podatki o posamezni živali ali skupni podatki o živalih.

Če katero od teh meril ni izpolnjeno, standardov učinkovitosti ni mogoče uporabiti za validacijo podobne ali spremenjene metode.

II. **Najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij**

6. Usklajeni ameriški ICCVAM, evropski ECVAM in japonski JaCVAM standardi učinkovitosti (12) določajo najkrajši možni seznam 18 referenčnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti, in štiri druge referenčne kemikalije (tj. snovi, ki so pri LLNA dale lažne pozitivne ali lažne negativne rezultate v primerjavi z rezultati pri človeku in morskih prašičkih (B.6, ali Smernica za preskušanje OECD 406) (13) in so zato lahko enako ali bolj učinkovite od LLNA), vključene v standarde učinkovitosti za LLNA. Merila za izbor za opredelitev teh kemikalij so bila:

— seznam referenčnih kemikalij predstavlja vrste snovi, ki se običajno preskušajo glede morebitnega povzročanja preobčutljivosti kože, in razpon odzivov, ki jih LLNA lahko meri ali napove;

— kemična struktura snovi je natančno opredeljena;

— za vsako snov so na voljo podatki LLNA iz preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13) in (kadar je mogoče) ljudeh; in

— snovi so dostopne pri tržnih virih.

Priporočene referenčne kemikalije so navedene v preglednici 1. Študije, ki uporabljajo predlagane referenčne kemikalije, morajo biti ocenjene v nosilcu, s katerim so navedene v preglednici 1. V primerih, ko navedena snov ni na voljo, se lahko z ustrezno utemeljitvijo uporabijo druge snovi, ki izpolnjujejo navedena merila za izbor.

▼M3

Preglednica 1

Priporočene referenčne kemikalije za standarde učinkovitosti za LLNA

Številka	Kemikalije ([1])	Št. CAS	Oblika	Nos ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5 x–2,0 x EC3	Dejanski razpon EC3	LLNA v primerjavi z MP	LLNA v primerjavi s človekom
1	5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on (CMI) in 2-metil-4-izotiazolin-3-on (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	tek.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NI	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	trd.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenilendiamin	106-50-3	trd.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	kobaltov klorid	7646-79-9	trd.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	izoevgenol	97-54-1	tek.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trd.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NI	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	tek.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	tek.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	evgenol	97-53-0	tek.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenil benzoat	93-99-2	trd.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	cimetov alkohol	104-54-1	trd.	AOO	21	1	10,5–42	NI	+/+	+/+
12	imidazolidinil urea	39236-46-9	trd.	DMF	24	1	12–48	NI	+/+	+/+
13	metil metakrilat	80-62-6	tek.	AOO	90	1	45–100	NI	+/+	+/+
14	klorobenzen	108-90-7	tek.	AOO	25	1	n.r.	n.r.	–/–	–/ (*)
15	izopropanol	67-63-0	tek.	AOO	50	1	n.r.	n.r.	–/–	–/+

▼M3

Številka	Kemikalije ([1])	Št. CAS	Oblika	Nos ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5 x–2,0 x EC3	Dejanski razpon EC3	LLNA v primerjavi z MP	LLNA v primerjavi s človekom
16	mlečna kislina	50-21-5	tek.	DMSO	25	1	n.r.	n.r.	–/–	–/ (*)
17	metil salicilat	119-36-8	tek.	AOO	20	9	n.r.	n.r.	–/–	–/–
18	salicilna kislina	69-72-7	trd.	AOO	25	1	n.r.	n.r.	–/–	–/–
Druge snovi za prikaz izboljšane učinkovitosti glede na LLNA										
19	natrijev lavrilsulfat	151-21-3	trd.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	etilen glikol dimetakrilat	97-90-5	tek.	MEK	28	1	14–56	NI	+/–	+/+
21	ksilen	1330-20-7	tek.	AOO	95,8	1	47,9–100	NI	+/ (**)	+/–
22	nikljev diklorid	7718-54-9	trd.	DMSO	5	2	n.r.	n.r.	–/+	–/+

Kratice: AOO = aceton olivno olje (4:1, v/v); št. CAS = številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov; DMF = *N,N*-dimetilformamid; DMSO = dimetil sulfoksid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenzen; EC3 = ocenjena koncentracija, potrebna za stimulacijski indeks 3; MP = rezultat preskusa na morskih prašičkih (tj. B. 6 ali Smernica za preskušanje OECD 406) (13); HCA = heksil cimetov aldehid; LLNA = rezultat lokalne analize bezgavk pri glodavcih (*tj.* B. 42 ali Smernica za preskušanje OECD 429) (1); MEK = metil etil keton; NI = ni izračunano, ker so bili podatki pridobljeni z eno samo študijo; n.r = ni relevantno, ker je stimulacijski indeks < 3; trd. = trdna snov; Nos = nosilec preskusa.

(*) Predvideva se, da pri ljudeh ni povzročitelj preobčutljivosti, ker niso bili najdeni nobeni rezultati kliničnih epikutanih testov, zato ni vključen v komplet za epikutano testiranje kot alergen, in najdenega ni bilo nobenega poročila o primeru preobčutljivosti pri človeku.

(**) Podatki o MP niso na voljo.

([1]) Kemikalije je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

([2]) Zaradi morebitnega vpliva različnih nosilcev na učinkovitost LLNA je treba uporabljati priporočen nosilec za vsako referenčno kemikalijo (24) (32).

([3]) Povprečna vrednost v primerih, ko je bila na voljo več kot ena vrednost EC3. Pri negativnih snoveh (tj. s stimulacijskim indeksom < 3) je navedena najvišja preskušena koncentracija.

([4]) Število študij LLNA, s katerimi so bili pridobljeni podatki.

([5]) Na tržišču na voljo pod imenom Kathon CG (št. CAS 55965-84-9), ki je zmes CMI in MI v razmerju 3:1. Relativne koncentracije vsake sestavine so od 1,1 % do 1,25 % (CMI) in od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktivne sestavine so magnezijeve soli (21,5 % do 24 %) in bakrov nitrat (0,15 % do 0,17 %), s preostalo sestavo 74 % do 77 % vode. Kathon CG je dostopen preko podjetij Sigma-Aldrich in Rohm and Haas (zdaj Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Opredeljeni standardi zanesljivosti in natančnosti**

7. Natančnost podobne ali spremenjene metode LLNA mora pri ocenjevanju z uporabo 18 referenčnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti, dosegati ali presegati natančnost standardov učinkovitosti za LLNA. Rezultat nove ali spremenjene metode mora biti pravilna razvrstitev na podlagi odločitve „da/ne“. Vendar pa nova ali spremenjena metoda morda ne bo pravilno razvrstila vseh 18 referenčnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti. Če je, na primer, eden od šibkih povzročiteljev preobčutljivosti napačno razvrščen, se lahko za dokaz enake učinkovitosti upoštevajo utemeljitev za napačno razvrstitev in ustrezni podatki (npr. rezultati preskusa, ki zagotavljajo pravilno razvrstitev drugih snovi s fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi ter lastnostmi, ki povzročajo preobčutljivost, podobnimi lastnostim napačno razvrščene referenčne kemikalije). V takih okoliščinah se status validacije novih in spremenjenih preskusnih metod za LLNA oceni za vsak primer posebej.

Ponovljivost v laboratoriju

8. Za ugotavljanje ponovljivosti v laboratoriju se nova ali prilagojena metoda LLNA oceni z uporabo snovi, ki povzroča preobčutljivost in je natančno opredeljena v LLNA. Zato standardi učinkovitosti za LLNA temeljijo na spremenljivosti rezultatov ponovljenih preskusov s heksil cimetovim aldehidom (HCA). Za oceno zanesljivosti v laboratoriju je treba vrednosti ocenjenega praga koncentracije (ECt) za HCA pridobiti ob štirih različnih priložnostih, med preskusi pa mora biti vsaj en teden razmaka. Sprejemljivo ponovljivost v laboratoriju kaže zmožnost laboratorija, da pri vsakem preskusu s HCA pridobi vrednosti ECt med 5 % in 20 %, kar predstavlja razpon od 0,5 do 2,0-krat povprečne ocenjene koncentracije, potrebne za stimulacijski indeks 3 (EC3), določene za HCA (10 %) pri LLNA (glej preglednico 1).

Ponovljivost v laboratorijih

9. Ponovljivost nove ali prilagojene metode LLNA v laboratorijih se oceni z uporabo dveh snovi, ki povzročata preobčutljivost in sta natančno opredeljeni v LLNA. Standardi učinkovitosti za LLNA temeljijo na spremenljivosti rezultatov preskusov s HCA in 2,4-dinitroklorobenzenom (DNCB) v različnih laboratorijih. Vrednosti ECt je treba pridobiti neodvisno in z eno samo študijo, izvedeno v vsaj treh ločenih laboratorijih. Za prikaz sprejemljive ponovljivosti v laboratorijih mora vsak laboratorij pridobiti vrednosti ECt od 5 % do 20 % za HCA in od 0,025 % do 0,1 % za DNCB, kar predstavlja razpon od 0,5 do 2,0-krat povprečne koncentracije EC3, določene za HCA (10 %) oziroma DNCB (0,05 %), pri LLNA (glej preglednico 1).

▼M3

Dodatek 2

Opredelitve pojmov

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata za pomen deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (14).

Primerjalna snov: snov, ki povzroča preobčutljivost ali je ne povzroča in se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskušanih snovi; (iii) znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) podporne podatke o znanih učinkih in (v) znano učinkovitost v razponu želene reakcije.

Ocenjen prag koncentracije (ECt): ocenjena koncentracija preskusne snovi, potrebne za stimulacijski indeks, ki kaže na pozitiven rezultat.

Ocenjena koncentracija tri (EC3): ocenjena koncentracija preskusne snovi, potrebne za stimulacijski indeks tri.

Lažno negativna snov: preskusna snov, ki je s preskusno metodo nepravilno opredeljena kot negativna ali neaktivna, čeprav je dejansko pozitivna ali aktivna.

Lažno pozitivna snov: preskusna snov, ki je s preskusom nepravilno opredeljena kot pozitivna ali aktivna, čeprav je dejansko negativna ali neaktivna.

Nevarnost: možnost škodljivega učinka na zdravje ali okolje. Do škodljivega učinka pride, če je raven izpostavljenosti dovolj visoka.

Ponovljivost v laboratorijih: merjenje obsega, v katerem lahko različni kvalificirani laboratoriji, ki uporabljajo isti protokol in preskušajo iste preskusne snovi, pridejo do kvalitativno in kvantitativno podobnih rezultatov. Ponovljivost v laboratorijih se ugotovi med postopki pred validacijo in med validacijo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi ponovljivost v različnih laboratorijih (14).

Ponovljivost v laboratoriju: določitev, obsega, v katerem lahko kvalificirane osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola v različnem času. Imenuje se tudi ponovljivost znotraj laboratorija (14).

Podobni preskus: pogovorni izraz za preskusno metodo, ki je strukturno in funkcijsko podobna potrjeni in uveljavljeni referenčni preskusni metodi. Takšna preskusna metoda je primerna za naknadno validacijo. Uporablja se izmenično s podobno preskusno metodo (14).

Izločitev: izločitev je ugotovitev, ki se izrazito razlikuje od drugih vrednosti v naključnem vzorcu populacije.

Standardi učinkovitosti: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi, na podlagi katere se lahko ocenjuje primerljivost predlagane preskusne metode, ki je v mehaničnem in funkcijskem smislu podobna. Obsegajo: i) nujne elemente preskusne metode, ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, in iii) podobne stopnje natančnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatu uporabe validirane preskusne metode, kar mora pri ocenjevanju dokazati predlagana preskusna metoda ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (14).

Lastniška preskusna metoda: preskusna metoda, pri kateri sta proizvodnja in distribucija omejeni s patenti, avtorskimi pravicami, blagovnimi znamkami itd.

▼**M3**

Zagotavljanje kakovosti: postopek upravljanja, pri katerem posamezniki, neodvisni od oseb, ki so izvajale preskuse, ocenijo izpolnjevanje laboratorijskih standardov za preskušanje, zahtev in postopkov vodenja evidenc ter natančnosti prenosa podatkov.

Referenčne kemikalije: kemikalije, izbrane za uporabo v postopku validacije, za katere so odzivi referenčnega preskusnega sistema ali želenih vrst *in vitro* ali *in vivo* že znani. Te kemikalije morajo biti reprezentativne za razrede kemikalij, za katere naj bi se uporabila preskusna metoda, predstavljati pa morajo celoten razpon odzivov, ki se jih lahko pričakuje od kemikalij, za katere bo morda uporabljena, od močnega, do šibkega, do negativnega. Za različne faze validacije in različne preskusne metode ter preskusne uporabe so lahko potrebne različne skupine referenčnih kemikalij (14).

Ustreznost: opis odnosa med preskusom in želenim učinkom ter njegovim pomenom in uporabnostjo za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove želeni biološki učinek. Ustreznost vključuje upoštevanje natančnosti (skladnosti) preskusne metode (14).

Zanesljivost: stopnja ponovljivosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (14).

Preobčutljivost kože: imunološki proces, ki se pojavi, ko je občutljiv posameznik lokalno izpostavljen kemičnemu alergenu, ki na koži sproži imunski odziv in lahko povzroči razvoj preobčutljivosti ob stiku.

Stimulacijski indeks (SI): vrednost, izračunana za oceno morebitne preobčutljivosti kože, ki jo lahko povzroči preskusna snov; je razmerje med množenjem v tretiranih skupinah in množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem.

Preskusna snov (imenovana tudi preskusna kemikalija): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi validacijskih študij določeni ustreznost (vključno z natančnostjo) in zanesljivost za določen namen. Treba je opozoriti, da natančnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bili sprejemljivi za predlagani namen (14).

▼B

B.43 ŠTUDIJA NEVROTOKSIČNOSTI NA GLODALCIH

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 424 (1997).

Ta preskusna metoda je namenjena pridobivanju informacij, ki so potrebne za potrditev ali nadaljnjo opredelitev potencialne nevrotoksičnosti kemikalij na odraslih živalih. Lahko se jo kombinira z obstoječimi preskusnimi metodami za študije strupenosti s ponavljajočimi odmerki ali pa se jo izvaja kot posebno študijo. Priporočljivo je, da se v pomoč pri načrtovanju študij, ki temeljijo na tej preskusni metodi, uporabijo napotki OECD o strategijah in metodah preskušanja nevrotoksičnosti (1). To je še posebej pomembno, kadar se razmišlja o spremembah postopkov opazovanja in preskušanja, ki se priporočajo za rutinsko uporabo te metode. Napotki so bili pripravljeni za olajšanje izbire drugih preskusnih postopkov za uporabo v posebnih okoliščinah.

Vrednotenje razvojne nevrotoksičnosti ni predmet te metode.

1.1 UVOD

Pri ocenjevanju in vrednotenju strupenih lastnosti kemikalij je pomembno, da se upošteva potencial za nevrotoksične učinke. Že preskusna metoda za sistemsko toksičnost s ponavljajočimi odmerki vključuje opazovanja, ki iščejo potencialno nevrotoksičnost. Ta preskusna metoda se lahko uporabi za načrtovanje študije za pridobitev nadaljnjih informacij ali potrditev informacij o nevrotoksičnih učinkih, ki jih pokažejo študije sistemske toksičnosti s ponavljajočimi odmerki. Vendar lahko upoštevanje potencialne nevrotoksičnosti nekaterih razredov kemikalij pokaže, da bi jih lahko primerneje ocenili z uporabo te metode brez predhodnih navedb o potencialni nevrotoksičnosti iz študij sistemske toksičnosti s ponavljajočimi odmerki. Taki razlogi vključujejo na primer:

— opazovanje nevroloških znakov ali nevropatoloških lezij v študijah toksičnosti, ki niso študije sistemske toksičnosti s ponavljajočimi odmerki, ali

— strukturno podobnost ali druge informacije o povezavah z znanimi nevrotoksikanti.

Poleg tega lahko obstajajo še drugi primeri, ko je primerna uporaba te preskusne metode; za nadaljnje podrobnosti glej (1).

Ta metoda je oblikovana tako, da se lahko prilagodi in v primeru posebnih potreb potrdi posebna histopatološka in vedenjska nevrotoksičnost kemikalij, pa tudi da se zagotovi označitev in količinska opredelitev nevrotoksičnih odzivov.

▼B

V preteklosti je bila nevrotoksičnost izenačena z nevropatijo, ki vključuje nevropatološke lezije ali nevrološke motnje, kot so božjast, paraliza ali tremor. Čeprav je nevropatija pomembna pojavna oblika nevrotoksičnosti, je danes jasno, da obstajajo številni drugi znaki toksičnosti živčnega sistema (npr. izguba motorične koordinacije, senzorične pomanjkljivosti, učne in spominske motnje), ki se ne odražajo v nevropatiji ali drugih vrstah študij.

Ta preskusna metoda za nevrotoksičnost je namenjena odkrivanju glavnih nevrovedenj skih in nevropatoloških učinkov na odraslih glodalcih. Čeprav lahko vedenjski učinki tudi v odsotnosti morfoloških sprememb odražajo škodljiv vpliv na organizem, niso vse vedenjske spremembe značilne za živčni sistem. Zato je treba vse opažene spremembe ovrednotiti skupaj s soodvisnimi histopatološkimi, hematološkimi ali biokemičnimi podatki, pa tudi s podatki o drugih vrstah sistemske toksičnosti. Preskušanje, ki se v tej metodi zahteva za zagotavljanje označitve in količinske opredelitve nevrotoksičnih odzivov, vključuje posebne histopatološke in vedenjske postopke, ki se lahko nadalje podprejo z elektrofiziološkimi in/ali biokemičnimi raziskavami (1) (2) (3) (4).

Nevrotoksikanti lahko delujejo na številne cilje v živčnem sistemu in z različnimi mehanizmi. Ker ni ene same vrste preskusov, s katerimi bi se lahko temeljito ovrednotilo nevrotoksičen potencial vseh snovi, je lahko potrebno izkoristiti druge *in vivo* ali *in vitro* preskuse, značilne za vrsto opazovane ali pričakovane nevrotoksičnosti.

Ta preskusna metoda se lahko uporablja tudi skupaj z navodili v napotkih OECD o strategijah in metodah preskušanja nevrotoksičnosti (1) za načrtovanje študij, ki so namenjene nadaljnji označitvi ali povečanju občutljivosti količinske opredelitve odziva na odmerek po vrstnem redu ali boljši oceni vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov ali utemeljitvi znanih ali domnevnih nevarnosti kemikalije. Na primer, študije se lahko namenijo ugotavljanju in vrednotenju nevrotoksičnega(-ih) mehanizma(-ov) ali dopolnitvi podatkov, ki so že na voljo iz uporabe osnovnih nevrovedenj skih in nevropatoloških postopkov opazovanja. Takim študijam ni treba ponoviti podatkov, ki bi jih dobili z uporabo standardnih postopkov, ki jih priporoča ta metoda, če so taki podatki že na voljo in ne štejejo za potrebne pri razlagi rezultatov študije.

Ta študija nevrotoksičnosti, če se uporablja samostojno ali v kombinaciji, zagotavlja informacije, s katerimi se lahko:

— ugotovi, ali je živčni sistem trajno ali reverzibilno prizadet zaradi preskušane kemikalije,

— prispeva k označitvi sprememb živčnega sistema, povezanih z izpostavljenostjo kemikaliji, in razumevanjem osnovnega mehanizma,

▼B

— določi odnose med odzivom na odmerek in časovnim odzivom, da bi ocenili vrednost brez opaznih škodljivih učinkov (ki se lahko uporablja za ugotavljanje varnostnih meril za kemikalijo).

Ta preskusna metoda uporablja oralno dajanje preskusne snovi. Drugi načini dajanja (npr. dermalno ali z vdihavanjem) so lahko primernejši in lahko zahtevajo spremembo priporočenih postopkov. Razlogi za izbiro načina dajanja so odvisni od profila človekove izpostavljenosti in razpoložljivih toksikoloških ali kinetičnih informacij.

1.2 OPREDELITVE POJMOV

Škodljivi učinek: je odstopanje od normalnega, povezano s tretiranjem, ki zmanjšuje sposobnost organizma za preživetje, razmnoževanje ali prilagoditev okolju.

Odmerek: je količina dane preskusne snovi. Odmerek je izražen kot masa (g, mg), kot masa preskusne snovi na enoto mase preskusne živali (npr. mg/kg) ali kot konstanta koncentracije v hrani (ppm).

Odmerjanje: je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostost in trajanje dajanja odmerka.

Nevrotoksičnost: je škodljiva sprememba strukture ali funkcije živčnega sistema, ki je posledica izpostavljenosti kemičnemu, biološkemu ali fizičnemu sredstvu.

Nevrotoksikant: je vsako kemično, biološko ali fizično sredstvo, ki ima potencial, da povzroča nevrotoksičnost.

NOAEL: je kratica za vrednost brez opaznih škodljivih učinkov (No Observed Adverse Effect Level) in je največji odmerek, pri katerem ne opazimo nobenega škodljivega učinka, povezanega s tretiranjem.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna kemikalija se daje oralno v vrsti odmerkov več skupinam laboratorijskih glodalcev. Navadno se zahtevajo ponavljajoči odmerki in režim odmerjanja je lahko 28 dni, subkroničen (90 dni) ali kroničen (1 leto ali dlje). Postopki, navedeni v tej preskusni metodi, se lahko uporabljajo tudi za študijo akutne nevrotoksičnosti. Živali se preskušajo, da bi omogočili odkrivanje ali označitev vedenjskih in/ali nevroloških anomalij. V vsakem obdobju opazovanja se ocenjuje vrsta vedenjskih oblik, ki jih lahko prizadenejo nevrotoksikanti. Na koncu preskusa se podskupina živali vsakega spola iz vsake skupine perfundira *in situ* in pripravijo ter preučijo se prerezi možganov, hrbtenjače in perifernih živcev.

Kadar se študija opravi kot samostojna študija za ugotavljanje nevrotoksičnosti ali za označitev nevrotoksičnih učinkov, se lahko živali iz vsake skupine, ki niso uporabljene za perfuzijo in naknadno histopatologijo (glej Tabelo 1), uporabijo za posebne nevrovedenj ske, nevropatološke, nevrokemične ali elektrofiziološke postopke, ki lahko dopolnijo podatke, dobljene s standardnimi preiskavami, ki se zahtevajo po tej metodi (1). Ti dopolnilni postopki so lahko še posebno koristni, kadar empirična opazovanja ali pričakovani učinki kažejo posebno vrsto ali cilj nevrotoksičnosti kemikalije. Preostale živali pa se lahko uporabijo za vrednotenja, kakor so tista, ki se zahtevajo v preskusnih metodah za študije toksičnosti s ponavljajočimi odmerki na glodalcih.

▼B

Kadar se postopki te preskusne metode kombinirajo s postopki drugih preskusnih metod, je potrebno zadostno število živali, da se izpolnijo zahteve obeh študij glede opazovanja.

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Izbira živalskih vrst**

Priporočena glodalska vrsta je podgana, čeprav se lahko ob utemeljitvi uporabi druga glodalska vrsta. Uporabijo se laboratorijski sevi mladih odraslih živali, ki se splošno uporabljajo. Samice morajo biti nuliparne in ne smejo biti breje. Dajanje odmerkov se mora normalno začeti čim prej po odstavitvi, po možnosti najpozneje takrat, ko so živali stare šest tednov in v vsakem primeru preden so živali stare devet tednov. Kadar pa se ta študija kombinira z drugimi študijami, je morda treba to starost prilagoditi. Razlike v masi posameznih živali na začetku študije ne smejo presegati ± 20 % povprečne mase za vsak spol. Če se kratkotrajna študija s ponavljajočimi odmerki izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo, je treba v obeh študijah uporabiti živali istega seva in vira.

1.4.2 **Nastanitvene in prehranjevalne razmere**

Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi naj bo 22 °C (± 3 °C). Čeprav naj bi bila relativna vlažnost najmanj 30 % in je zaželeno, da ne presega 70 %, razen v času čiščenja prostora, je cilj 50–60 %. Osvetlitev naj bo umetna, zaporedje 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Glasnega ponavljajočega hrupa naj bo čim manj. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo. Na izbiro prehrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne snovi, kadar se daje po tej metodi. Živali se lahko namestijo posamično ali dajo v kletke v manjših skupinah istega spola.

1.4.3 **Priprava živali**

Zdrave mlade živali se naključno dodelijo v tretirano in kontrolno skupino. Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi pozicije kletk čim manjši. Živali se na enoten način identificirajo in zadržijo v kletkah (5) dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

1.4.4 **Način dajanja in priprava odmerkov**

Ta preskusna metoda se posebej ukvarja z oralnim dajanjem preskusne snovi. Oralno dajanje je lahko z gavažo, hrano, pitno vodo ali kapsulami. Drugi načini dajanja (npr. dermalno ali z vdihavanjem) so lahko primernejši in lahko zahtevajo spremembo priporočenih postopkov. Razlogi za izbiro načina dajanja so odvisni od profila človekove izpostavljenosti in razpoložljivih toksikoloških ali kinetičnih informacij. Treba je navesti utemeljitev za izbiro načina dajanja, pa tudi posledične spremembe postopkov te preskusne metode.

▼B

Po potrebi se lahko preskusna snov raztopi ali suspendira v primernem nosilcu. Priporočljivo je, da se najprej razmisli o uporabi vodne raztopine/suspenzije, potem o raztopini/suspenziji v olju (npr. koruznem olju) in šele nato o možni raztopini/suspenziji v drugih nosilcih. Strupene lastnosti nosilca morajo biti znane. Poleg tega je treba upoštevati naslednje lastnosti nosilca: učinke nosilca na absorpcijo, distribucijo, presnovo ali retencijo preskusne snovi, ki lahko spremenijo njene toksične lastnosti; ter učinke na porabo hrane ali vode ali status prehranjenosti živali.

1.5 POSTOPKI

1.5.1 **Število in spol živali**

Kadar se študija opravi kot posebna študija, je treba uporabiti najmanj 20 živali (10 samic in 10 samcev) v vsaki skupini odmerka in v kontrolni skupini za vrednotenje podrobnih kliničnih in funkcionalnih opazovanj. Najmanj pet samcev in pet samic, izbranih izmed teh 10 samcev in 10 samic, je treba perfundirati *in situ* in uporabiti za podrobno nevrohistopatologijo na koncu študije. V primerih, ko se glede nevrotoksičnih učinkov opazuje le omejeno število živali v dani skupini odmerka, je treba upoštevati vključitev teh živali med živali, izbrane za perfuzijo. Kadar se študija izvede v kombinaciji s študijo toksičnosti s ponavljajočimi odmerki, je treba uporabiti zadostno število živali, da so izpolnjeni cilji obeh študij. Najmanjše število živali na skupino za različne kombinacije študij je podano v Tabeli 1. Če se načrtujejo vmesne usmrtitve ali obnovitvene skupine za opazovanje reverzibilnosti, obstojnosti ali zapoznelega nastopa toksičnih učinkov po tretiranju ali če se razmišlja o dopolnilnih opazovanjih, je treba število živali povečati, da se zagotovi, da je na voljo število živali, ki je potrebno za opazovanje in histopatologijo.

1.5.2 **Tretirane in kontrolne skupine**

Na splošno se uporabijo najmanj tri skupine odmerkov in kontrolna skupina, a če se po oceni drugih podatkov ne pričakuje nobenih učinkov pri ponavljajočem odmerku 1 000 mg/kg telesne mase/dan, se lahko izvede mejni preskus. Če ni na voljo primernih podatkov, se lahko izvede študija za ugotavljanje območja odmerkov, da pomaga določiti odmerke, ki se naj uporabijo. Razen pri tretiranju s preskusno snovjo, morajo biti živali v kontrolni skupini obravnavane enako kakor živali v preskusni skupini. Če je pri dajanju preskusne snovi uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti količino nosilca, enako največji uporabljeni količini.

1.5.3 **Preverjanje zanesljivosti**

Laboratorij, ki izvaja študijo, mora predložiti podatke, ki dokazujejo njegovo sposobnost za izvedbo študije in občutljivost uporabljenih postopkov. Ti podatki morajo zagotoviti dokaz o sposobnosti odkrivanja in po potrebi količinske opredelitve sprememb različnih ciljnih učinkov, ki se priporočajo za opazovanje, na primer avtonomnih znakov, senzoričnih reakcij, moči nožnega oprijema in motorične aktivnosti. Informacije o kemikalijah, ki povzročajo različne vrste nevrotoksičnih odzivov in bi se lahko uporabljaje kot snovi pozitivne kontrole, so v sklicih od 2 do 9. Pretekli podatki se lahko uporabijo, če ostanejo bistveni vidiki poskusnih postopkov enaki. Priporoča se občasno posodabljanje preteklih podatkov. Kadar izvajalski laboratorij spremeni kak bistven element pri izvajanju preskusa ali postopkov, je treba razviti nove podatke, ki izkazujejo nadaljnjo občutljivost postopkov.

▼B

1.5.4 **Izbira odmerkov**

Velikosti odmerkov se izberejo ob upoštevanju vsake predhodno opažene toksičnosti in kinetičnih podatkov, ki so na voljo za preskusne zmesi ali sorodne materiale. Največjo velikost odmerka je treba izbrati s ciljem povzročitve nevrotoksičnih učinkov ali jasnih sistemskih toksičnih učinkov. Padajoče zaporedje velikosti odmerkov je treba potem izbrati tako, da se pokažejo vse reakcije, ki so odvisne od odmerka, in vrednost brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL) pri najnižji velikosti odmerka. Načeloma je treba velikosti odmerkov določiti tako, da se lahko primarni toksični učinki na živčni sistem ločijo od učinkov, ki so povezani s sistemsko toksičnostjo. Dvakratni do trikratni intervali so pogosto najprimernejši, večinoma pa je bolje dodati dodatno, četrto preskusno skupino, kakor uporabiti zelo velike intervale med odmerki (npr. več kakor faktor 10). Kadar obstaja primerna ocena človekove izpostavljenosti, je treba upoštevati tudi to.

1.5.5 **Mejni preskus**

Če študija pri eni velikosti odmerka najmanj 1 000 mg/kg telesne mase/dan, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne da opaznih nevrotoksičnih učinkov, in če toksičnost ni pričakovana glede na podatke o strukturno sorodnih zmeseh, potem popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov morda ne bo potrebna. Pričakovana človekova izpostavljenost lahko narekuje potrebo, da se v mejnem preskusu uporabi večji oralni odmerek. Pri drugih vrstah dajanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne snovi pogosto določajo največjo dosegljivo raven izpostavljenosti. Za izvedbo akutne oralne študije mora biti odmerek za mejni preskus najmanj 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Dajanje odmerkov**

Živali dobivajo odmerek preskusne snovi dnevno, sedem dni v tednu, najmanj 28 dni; uporabo petdnevnega režima odmerjanja ali krajše obdobje izpostavljenosti je treba utemeljiti. Če se preskusna snov daje z gavažo, jo je treba dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Maksimalna količina tekočine, ki jo je mogoče dati naenkrat, je odvisna od velikosti poskusnih živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne mase. Vendar se lahko v primeru vodnih raztopin upošteva uporaba do 2 ml/100 g telesne mase. Razen pri dražečih ali jedkih snoveh, ki pri višjih koncentracijah navadno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusnega volumna s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, zato da bi zagotovili konstantno količino pri vseh odmerkih.

Pri snoveh, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne snovi ne vplivajo na običajno raven vnosa hrane ali porabe vode. Kadar se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi bodisi konstantna koncentracija v hrani (ppm) bodisi konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali; treba je navesti uporabljeni način. Če snov dajemo z gavažo, je treba odmerke dati vsak dan približno ob istem času in jih ustrezno prilagoditi, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali. Če se študija s ponavljajočimi odmerki izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano. Pri akutnih študijah se lahko odmerek, če posamezni odmerek ni mogoč, daje v manjših delih v obdobju, ki ne presega 24 ur.

▼B

1.6 OPAZOVANJE

1.6.1 **Pogostost opazovanj in preskusov**

Pri študijah s ponavljajočimi odmerki se obdobje opazovanja prekriva z obdobjem dajanja odmerka. Pri akutnih študijah je treba opazovati 14-dnevno obdobje po tretiranju. Pri živalih v satelitskih skupinah, ki ostanejo v obdobju po tretiranju neizpostavljene, opazovanja zajemajo tudi to obdobje.

Opazovanja se opravijo dovolj pogosto, da je čim večja možnost za odkritje vedenjskih in/ali nevroloških anomalij. Opazovanja je najbolje opraviti vsak dan ob istem času, pri čemer se upošteva vrhunec pričakovanih učinkov po odmerjanju. Pogostost kliničnih opazovanj in funkcionalnih preskusov je povzeta v Tabeli 2. Če kinetični ali drugi podatki, ki so dobljeni iz prejšnjih študij, kažejo na potrebo po uporabi drugih časov za opazovanja, preskuse ali obdobja po opazovanju, je treba sprejeti drugačen razpored, da bi dobili čim več informacij. Spremembe programa je treba utemeljiti.

1.6.1.1 *Opazovanja splošnega zdravstvenega stanja in smrtnosti/obolevnosti*

Vse živali je treba najmanj enkrat dnevno natančno opazovati glede zdravstvenega stanja, najmanj dvakrat dnevno pa tudi glede obolevnosti in smrtnosti.

1.6.1.2 *Podrobna klinična opazovanja*

Podrobna klinična opazovanja se na vseh živalih, ki so izbrane v ta namen (glej Tabelo 1), opravijo enkrat pred prvo izpostavljenostjo (zaradi primerjav na istem osebku) in potem v različnih presledkih, odvisno od trajanja študije (glej Tabelo 2). Podrobna klinična opazovanja satelitskih obnovitvenih skupin je treba opraviti na koncu obnovitvenega obdobja. Podrobna klinična opazovanja je treba opraviti zunaj domače kletke na standardnem mestu. Opažanja je treba skrbno dokumentirati s pomočjo meril in točkovanj za vsako meritev pri opazovanju. Laboratorij, ki opravlja preskus, mora jasno opredeliti merila ali lestvice. Prizadevati si je treba, da so odstopanja od pogojev preskušanja čim manjša (ne sistematično povezana s tretiranjem) in da opazovanja izvajajo usposobljeni opazovalci, ki ne poznajo dejanskega tretiranja.

Priporočljivo je, da se opazovanja izvajajo na strukturiran način, kjer se dobro opredeljena merila (vključno z opredelitvijo normalnega „območja“) uporabljajo sistematično za vsako žival v vsakem opazovalnem času. „Normalno območje“ mora biti ustrezno dokumentirano. Vse opažene znake je treba zabeležiti. Vedno, kadar je to izvedljivo, se zabeleži tudi velikost opaženih znakov. Klinična opazovanja morajo obsegati tudi, vendar ne samo, spremembe na koži, kožuhu, očeh, sluznicah, pojav sekrecije in ekskrecije ter delovanje avtonomnega živčevja (npr. lakrimacija, piloerekcija, velikost zenic, nenormalen vzorec dihanja in/ali dihanje skozi usta, vsi nenavadni znaki uriniranja in izločanja blata ali razbarvan urin).

▼B

Zapisati je treba tudi vse nenavadne odzive v zvezi s položajem telesa, stopnjo aktivnosti (npr. zmanjšanje ali povečanje raziskovanja standardnega mesta) in koordinacijo gibov. Zabeležiti je treba spremembe v hoji (npr. zibanje, ataksija), drži (npr. grbast hrbet) in reagiranju na ravnanje, nameščanje ali druge okoljske dražljaje, pa tudi navzočnost kloničnih ali toničnih gibov, krčev ali tremorja, stereotipe (npr. prekomernega čiščenja, nenavadnih gibov z glavo, ponavljajočega se krožnega premikanja) ali nenormalno vedenje (npr. grizenje ali čezmerno lizanje, samomaličenje, zadenjsko hojo, oddajanje zvokov) ali agresivnost.

1.6.1.3 *Funkcionalni preskusi*

Podobno kakor podrobna klinična opazovanja je treba tudi funkcionalne preskuse izvesti enkrat pred izpostavljenostjo in potem pogosto pri vseh živalih, izbranih v ta namen (glej Tabelo 1). Tudi pogostost funkcionalnega preskušanja je odvisna od trajanje študije (glej Tabelo 2). Poleg obdobij opazovanja iz Tabele 2 je treba tudi funkcionalna opazovanja o satelitskih obnovitvenih skupinah opraviti čim bliže končni usmrtitvi. Funkcionalni preskusi vključujejo senzorične reakcije na različne dražljaje [npr. akustične, vizualne in proprioceptivne dražljaje (5) (6) (7)], oceno moči nožnega oprijema (8) in oceno motorične aktivnosti (9). Motorično aktivnost je treba izmeriti z avtomatiziranim sredstvom, ki lahko odkrije oboje, zmanjšanje in povečanje aktivnosti. Če se uporabi drug opredeljen sistem, mora biti količinski in z dokazano občutljivostjo in zanesljivostjo. Vsako sredstvo mora biti preskušeno, da je zagotovljena zanesljivost v času in skladnost med sredstvi. Nadaljnje podrobnosti glede možnih postopkov so podane v navedeni literaturi. Če ni podatkov (npr. o strukturni aktivnosti, epidemioloških podatkov, drugih toksikoloških študij) za navedbo potencialnih nevrotoksičnih učinkov, je treba razmisliti o vključitvi bolj specializiranih preskusov za podrobnejšo preučitev možnih učinkov senzorične in motorične funkcije ali učenja in spominjanja. Več informacij o bolj specializiranih preskusih in njihovi uporabi je navedenih v (1).

Izjemoma se lahko živali, ki kažejo znake toksičnosti v takem obsegu, da bi znatno vplivali na funkcionalni preskus, izpustijo pri tem preskusu. Izločitev živali iz funkcionalnega preskusa je treba utemeljiti.

1.6.2 **Telesna masa in poraba hrane/vode**

Pri študijah, ki trajajo do 90 dni, je treba vse živali stehtati najmanj enkrat na teden in meriti porabo hrane (porabo vode, kadar se preskusna snov daje v tem mediju) najmanj tedensko. Pri dolgotrajnih študijah je treba prvih 13 tednov vse živali stehtati najmanj enkrat na teden in potem najmanj enkrat na 4 tedne. Meritve porabe hrane (porabe vode, kadar se preskusna snov daje v tem mediju) je treba v prvih 13 tednih opravljati najmanj tedensko in potem v približno trimesečnih presledkih, razen če zdravstveno stanje ali spremembe telesne mase narekujejo drugače.

▼B

1.6.3 **Oftalmologija**

Pri študijah, ki trajajo dlje kakor 28 dni, je treba oftalmološko preiskavo z uporabo oftalmoskopa ali ustreznega enakovrednega instrumenta izvesti pred dajanjem preskusne snovi in na koncu študije, najbolje na vseh živalih, vendar vsaj v skupini živali z velikim odmerkom in v kontrolni skupini. Če se odkrijejo spremembe na očeh ali če klinični znaki narekujejo tako potrebo, je treba preiskati vse živali. Pri dolgotrajnih študijah je treba oftalmološko preiskavo izvesti tudi po 13 tednih. Oftalmoloških preiskav ni treba izvajati, če so ti podatki že na voljo iz drugih študij s podobnim trajanjem in podobno velikostjo odmerkov.

1.6.4 **Hematologija in klinična biokemija**

Kadar se študija nevrotoksičnosti izvaja v kombinaciji s študijo sistemske toksičnosti s ponavljajočimi odmerki, je treba opraviti hematološke preiskave in klinične biokemične določitve, kakor je določeno v metodi za študije sistemske toksičnosti. Zbiranje vzorcev je treba izvajati na tak način, da so potencialni učinki na nevrovedenje čim manjši.

1.6.5 **Histopatologija**

Nevropatološke preglede je treba načrtovati tako, da dopolnjujejo in razširijo opazovanja, opravljena med fazo študije *in vivo*. Tkiva najmanj 5 živali na spol in skupino (glej Tabelo 1 in naslednji odstavek) se fiksirajo *in situ* z uporabo splošno priznanih tehnik perfuzije in fiksacije (glej sklic 3, poglavje 5 in sklic 4, poglavje 50). Zabeležijo se vse večje opazne spremembe. Kadar se študija opravlja kot samostojna študija presejanja nevrotoksičnosti ali za označitev nevrotoksičnih učinkov, se lahko preostale živali uporabijo za posebne nevrovedenjske (10) (11), nevropatološke (10) (11) (12) (13), nevrokemične (10) (11) (14) (15) ali elektrofiziološke (10) (11) (16) (17) postopke, ki lahko dopolnijo tukaj opisane postopke in preiskave ali povečajo število histopatološko preučevanih osebkov. Ti dopolnilni postopki so lahko še posebno koristni, kadar empirična opazovanja ali pričakovani učinki kažejo posebno vrsto ali cilj nevrotoksičnosti (2) (3). Preostale živali pa se lahko uporabijo tudi za rutinska patološka vrednotenja, opisana v metodi za študije s ponavljajočimi odmerki.

Vse vzorce tkiva, vstavljene v parafin, je treba barvati po splošnem postopku, na primer s hematoksilinom in eozinom (H&E), in izvesti mikroskopski pregled. Če se opazijo ali domnevajo znaki periferne nevropatije, je treba preiskati v plastiko vstavljene vzorce perifernega živčnega tkiva. Klinični znaki lahko nakazujejo tudi dodatna mesta za preiskavo ali uporabo posebnih postopkov barvanja. Napotki o dodatnih mestih za preiskavo so v (3) (4). V pomoč pri dokazovanju posebnih vrst patoloških sprememb so lahko tudi ustrezne posebne barve (18).

▼B

Reprezentativne prereze osrednjega in perifernega živčnega sistema je treba histološko pregledati (glej sklic 3, poglavje 5 in sklic 4, poglavje 50). Pregledana območja navadno vključujejo: velike možgane, osrednji del možganov (limbični sistem), skupaj s prerezom hipokampusa, medmožgane, male možgane, pons, medulo oblongato, oko z vidnim živcem in mrežnico, hrbtenjačo ob vratnem in ledvenem delu, spinalne ganglije, dorzalna in ventralna vlakna, proksimalni bedrni živec, proksimalni golenični živec (pri kolenu) in veje goleničnega živca v mečni mišici. Rezine hrbtenjače in perifernih živcev vključujejo prečne ali diagonalne in vzdolžne prereze. Pozornost je treba posvetiti ožilju živčnega sistema. Pregledati je treba tudi vzorec skeletne mišice, zlasti mečne mišice. Posebno pozornost je treba posvetiti mestom s celično in vlaknasto strukturo in vzorcu v osrednjem in perifernem živčnem sistemu, za katere je znano, da jih nevrotoksikanti posebno prizadenejo.

Napotki o nevropatoloških spremembah, ki so tipična posledica izpostavljenosti toksičnim snovem, so v sklicih (3)(4). Priporoča se postopna preučitev vzorcev, pri kateri se s kontrolno skupino najprej primerjajo prerezi iz skupine z velikim odmerkom. Če se v vzorcih iz teh skupin ne opazi nobene nevropatološke spremembe, nadaljnja analiza ni potrebna. Če se v skupini z velikim odmerkom opazijo nevropatološke spremembe, je treba potem zaporedno preučiti in označiti vzorce iz vseh potencialno prizadetih tkiv iz skupin s srednjim in majhnim odmerkom.

Če se pri pregledu kakovosti najde kakršen koli dokaz o nevropatoloških spremembah, potem je treba drugi pregled opraviti na vseh območjih živčnega sistema, ki kaže te spremembe. Prereze iz vseh skupin odmerkov iz vsakega potencialno prizadetega območja je treba označiti in preučiti naključno, brez poznavanja oznake. Pogostost in resnost vsake lezije je treba zabeležiti. Ko so ocenjena vsa območja iz vseh skupin odmerkov, se lahko oznaka razčleni in opravi statistična analiza za ovrednotenje odnosov med odmerkom in odzivom. Opisati je treba primere različnih stopenj resnosti za vsako lezijo.

Nevropatološke ugotovitve je treba ovrednotiti v smislu vedenjskih opazovanj in meritev, pa tudi drugih podatkov iz prejšnjih in sočasnih študij sistemske toksičnosti preskusne snovi.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Predložiti je treba podatke za vsako posamezno žival. Nadalje je treba vse podatke prikazati v obliki tabele, iz katere so za vsako preskusno ali kontrolno skupino razvidni naslednji podatki: število živali na začetku preskusa in število živali, med preskusom najdenih mrtvih ali usmrčenih iz humanih razlogov, nato čas smrti oziroma humane usmrtitve, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis opaženih znakov toksičnosti, vključno s časom, ko so toksični učinki prvikrat nastopili, njihovim trajanjem, vrsto in jakostjo, število živali s poškodbami, vključno z vrsto in resnostjo poškodb.

▼B

2.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA REZULTATOV

Ugotovitve študije je treba ovrednotiti glede na pojavnost, resnost in soodvisnost nevrovedenj skih in nevropatoloških učinkov (vključeni so nevrokemij ski ali elektrofiziološki učinki, pa tudi dopolnilne preiskave) ter drugih opaženih škodljivih učinkov. Če je mogoče, je treba numerične podatke ovrednotiti s primerno splošno sprejeto statistično metodo. Statistične metode se izberejo med načrtovanjem študije.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje (vključno z izomerizmom, čistostjo in fizikalno-kemijskimi lastnostmi),

— identifikacijske podatke.

Nosilec (po potrebi):

— utemeljitev izbire nosilca.

Preskusne živali:

— uporabljeno vrsto/sev,

— število, starost in spol živali,

— izvor, nastanitvene razmere, prilagoditev, hrano ipd.,

— maso posameznih živali na začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— podatke o sestavi preskusne snovi/pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka:

— specifikacijo uporabljenih odmerkov, vključno s podatki o nosilcu, količini in fizični obliki danega materiala,

— podatke o dajanju preskusne snovi,

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov,

— utemeljitev načina in trajanja izpostavljenosti,

— preračunavanje koncentracije preskusne snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne mase/dan), če je primerno,

— podatke o kakovosti hrane in vode.

Opazovanje in preskusni postopki:

— podatke o dodelitvi živali iz vsake skupine v perfuzij ske podskupine,

— podatke o sistemih točkovanja, vključno z merili in točkovalnimi lestvicami za vsako meritev v podrobnih kliničnih opazovanjih,

▼B

— podatke o funkcionalnih preskusih za senzorične reakcije na različne dražljaje (npr. akustične, vizualne in proprioceptivne); za ocenjevanje moči nožnega oprijema; za ocenjevanje motorične aktivnosti (vključno s podatki o avtomatiziranih sredstvih za odkrivanje aktivnosti); in drugih uporabljenih postopkih,

— podatke o oftalmoloških preiskavah in, če je primerno, hematoloških preiskavah in kliničnih biokemijskih preskusih z ustreznimi normalnimi vrednostmi,

— podatke za posebne nevrovedenjske, nevropatološke, nevrokemične ali elektrofiziološke postopke.

Rezultati:

— telesno maso/spremembe telesne mase, vključno s telesno maso ob usmrtitvi,

— porabo hrane in porabo vode, kar je primerno,

— podatke o toksičnem učinkovanju glede na spol in velikost odmerka, vključno z znaki toksičnosti,

— vrsto, resnost in trajanje (čas začetka in poznejši potek) podrobnih kliničnih opazovanj (ali so reverzibilna ali ne),

— natančen opis vseh rezultatov funkcionalnega preskusa,

— ugotovitve obdukcije,

— podroben opis vseh nevrovedenjskih, nevropatoloških in nevrokemijskih ali elektrofizioloških ugotovitev, če so na voljo,

— podatke o absorpciji in presnovi, če so na voljo,

— statistično obdelavo rezultatov, po potrebi.

Razprava o rezultatih:

— informacije o odzivu na odmerek,

— odnos katerih koli drugih toksičnih učinkov do zaključka o nevrotoksičnem potencialu preskusne kemikalije,

— vrednost brez opaznih škodljivih učinkov.

Zaključki:

— zaželena je posebna izjava o celotni nevrotoksičnosti preskusne kemikalije.

4. **LITERATURA**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris. V pripravi.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. V pripravi.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., I, 233–236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689–695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343–352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445–452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Then, 244, 368–378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299–335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, pp. 726–742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabela 1

Najmanjše število živali, ki so potrebne na skupino, kadar se študija nevrotoksičnosti izvaja posebej ali v kombinaciji s študijami

	ŠTUDIJA NEVROTOKSIČNOSTI, IZVEDENA KOT:			
	Posebna študija	Kombinirana študija z 28-dnevno študijo	Kombinirana študija z 90-dnevno študijo	Kombinirana študija s študijo kronične toksičnosti
Skupno število živali na skupino	10 samcev in 10 samic	10 samcev in 10 samic	15 samcev in 15 samic	25 samcev in 25 samic
Število živali, izbranih za funkcionalno preskušanje, vključno s podrobnimi kliničnimi opazovanji	10 samcev in 10 samic	10 samcev in 10 samic	10 samcev in 10 samic	10 samcev in 10 samic
Število živali, izbranih za perfuzijo *in situ* in nevrohistopatologijo	5 samcev in 5 samic	5 samcev in 5 samic	5 samcev in 5 samic	5 samcev in 5 samic
Število živali, izbranih za opazovanja toksičnosti s ponavljajočimi odmerki/subkronično/kronično, hematologijo, klinično biokemijo, histopatologijo itd., kakor je navedeno v zadevnih *Smernicah*		5 samcev in 5 samic	10 samcev † in 10 samic †	20 samcev † in 20 samic †
Po potrebi dopolnilna opazovanja	5 samcev in 5 samic			

† Vključuje pet živali, izbranih za funkcionalno preskušanje in podrobna klinična opazovanja kot del študije nevrotoksičnosti.

▼B

Tabela 2

Pogostost kliničnih opazovanj in funkcionalnih preskusov

Vrsta opazovanja		Trajanje študije			
		Akutno	28 dni	90 dni	Kronično
Pri vseh živalih	Splošno zdravstveno stanje	dnevno	dnevno	dnevno	dnevno
	Smrtnost/obolevnost	dvakrat dnevno	dvakrat dnevno	dvakrat dnevno	dvakrat dnevno
Pri živalih, izbranih za funkcionalna opazovanja	Podrobna klinična opazovanja	— pred prvo izpostavljenostjo — v 8 urah po odmerjanju v pričakovanem času vrhunca učinka — 7. in 14. dan po odmerjanju	— pred prvo izpostavljenostjo — potem enkrat tedensko	— pred prvo izpostavljenostjo — enkrat v prvem ali drugem tednu izpostavljenosti — potem mesečno	— pred prvo izpostavljenostjo — enkrat na koncu prvega meseca izpostavljenosti — potem vsake tri mesece
	Funkcionalni preskusi	— pred prvo izpostavljenostjo — v 8 urah po odmerjanju v pričakovanem času vrhunca učinka — 7. in 14. dan po odmerjanju	— pred prvo izpostavljenostjo — v četrtem tednu tretiranja čim bliže koncu obdobja izpostavljenosti	— pred prvo izpostavljenostjo — enkrat v prvem ali drugem tednu izpostavljenosti — potem mesečno	— pred prvo izpostavljenostjo — enkrat na koncu prvega meseca izpostavljenosti — potem vsake tri mesece

▼B

B.44 ABSORPCIJA SKOZI KOŽO: METODA *IN VIVO*

1. METODA

Ta preskusna metoda je enakovredna OECD TG 427 (2004).

1.1 UVOD

Izpostavljenost številnim kemikalijam se v glavnem dogaja skozi kožo, medtem ko se pri večini toksikoloških študij, opravljenih na živalih v laboratoriju kemikalije dajejo oralno. Študija perkutane absorpcije *in vivo,* določena v teh smernicah vzpostavlja povezavo, potrebno za ekstrapoliranje iz oralnih študij, pri ocenah varnosti po izpostavljenosti kože.

Snov mora preiti veliko celičnih plasti kože, preden lahko pride do obtoka. Plast, ki določa stopnjo za večino snovi, je *stratum corneum* (rožena plast), sestavljena iz mrtvih celic. Prepustnost skozi kožo je odvisna tako od lipofilnosti kemikalije in debeline zunanje plasti epidermisa, kakor tudi od dejavnikov, kot je molekulska masa in koncentracija snovi. V splošnem je koža podgan in kuncev bolj prepustna od človeške kože, prepustnost kože morskih prašičkov in opic pa je bolj podobna prepustnosti človeške kože.

Metode za merjenje absorpcije skozi kožo so razdeljene v dve kategoriji: *in vivo* ter *in vitro.* Po metodi *in vivo* lahko pridobimo dobre informacije o absorpciji skozi kožo za različne laboratorijske vrste. V zadnjem času so se bolj razvile metode *in vitro.* Pri le-teh se uporablja prenos čez celotno ali delno debelino živalske ali človeške kože v posodo s tekočino. Metoda *in vitro je* opisana posebej v ločeni preskusni metodi (1). Priporočljivo je, da se preverijo Napotki OECD za izvajanje študij o absorpciji skozi kožo (2) kot pomoč pri izbiri najbolj ustrezne metode v dani situaciji, saj vsebujejo več podrobnosti o ustreznosti tako *in vivo,* kakor tudi *in vitro* metode.

Metoda *in vivo,* ki je tu opisana, omogoča določanje penetracije preskusne snovi skozi kožo v sistemski prostor. Ta tehnika se uporablja že mnogo let (3) (4) (5) (6) (7). Čeprav so študije perkutane absorpcije *in vitro* v številnih primerih lahko ustrezne, pa v določenih situacijah le študija *in vivo* lahko da potrebne podatke.

Prednosti metode *in vivo* so, da uporablja fiziološko in presnovno nedotaknjen sistem, uporablja vrste, ki so skupne številnim toksikološkim študijam in se lahko spreminja za uporabo pri drugih vrstah. Slabo stran pa predstavljajo uporaba živih živali, potreba po materialu, označenem z radioaktivnim izotopom za omogočanje zanesljivih rezultatov, težave pri določanju faze zgodnje absorpcije ter razlike v prepustnosti kože zaželenih vrst (podgane) in človeške kože. Živalska koža je v splošnem bolj prepustna in zato se lahko prekutana absorpcija pri človeku preceni (6) (8) (9). Kavstične/korozivne snovi se na živih živalih ne preskušajo.

▼B

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Neabsorbirani odmerek: pomeni odmerek, izpran s površine kože po izpostavljenosti in vsak odmerek, prisoten na neokluzivni ovojnici, vključno z vsakim odmerkom, ki bo izhlapel iz kože med izpostavljenostjo.

Absorbirani odmerek *(in vivo):* je odmerek, prisoten v urinu, ostankih izpiranja kletke, iztrebkih, izdihanem zraku (če se meri), krvi, tkivih (če se odvzemajo) in preostalem trupu po odstranitvi mesta kože za nanos.

Absorpcijski odmerek: pomeni odmerek, prisoten na ali v koži po izpiranju.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusna snov, ki naj bo označena z radioaktivnim izotopom, se nanese na pobrito kožo živali v eni ali več ustreznih velikostih odmerka v obliki reprezentančnega pripravka v uporabi. Preskusni pripravek se pusti v stiku s kožo določeno časovno obdobje pod ustrezno ovojnico (neokluzivno, polokluzivno ali okluzivno) zaradi preprečitve zaužitja preskusnega pripravka. Ob koncu obdobja izpostavljenosti se ovojnica odstrani in koža se očisti z ustreznim čistilnim sredstvom, ovojnica ter čistilna sredstva se shranijo za analizo, uporabi pa se sveža ovojnica. Živali so nastanjene v posameznih presnovnih kletkah pred, med in po obdobju izpostavljenosti, iztrebki in izdihani zrak v tem obdobju pa se zberejo za analizo. Zbiranje izdihanega zraka se lahko opusti, če je dovolj podatkov, da se ustvarja malo ali nič hlapnih radioaktivnih metabolitov. V vsako študijo je običajno vključenih več skupin živali, ki bodo izpostavljene preskusnemu pripravku. Na koncu obdobja izpostavljenosti se eno skupino usmrti. Druge skupine se zatem usmrtijo v rednih časovni razmikih (2). Ob koncu obdobja vzorčenja se preostale živali usmrtijo, odvzame se kri za analizo, prostor nanosa se odstrani za analizo, trupi pa se analizirajo zaradi morebitnih neiztrebljenih snovi. Vzorci se preskusijo z ustreznimi sredstvi in oceni se stopnja prekutane absorpcije (6) (8) (9).

1.4 OPIS METODE

1.4.1 **Izbira živalskih vrst**

Najbolj pogosto uporabljene vrste so podgane, lahko pa se uporabljajo tudi linije brez dlak in vrste, katerih stopnje absorpcije skozi kožo so bolj podobne človeškim (3) (6) (7) (8) (9). Uporabljajo se mlade, odrasle, zdrave živali enega spola (privzet je moški spol) in linij, ki se običajno uporabljajo v laboratorijih. Ob začetku študije teža uporabljenih živali ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže. Primerne so, na primer, podgane moškega spola s težo 200 g–250 g, zlasti v zgornji polovici tega obsega.

▼B

1.4.2 **Število in spol živali**

Skupina vsaj štirih živali enega spola se uporabi za vsak preskusni pripravek in vsak načrtovan čas usmrtitve. Skupine živali se usmrtijo v različnih časovnih razmikih, najprej na primer ob koncu obdobja izpostavljenosti (tipično 6 ali 24 ur) in nato naslednje (npr. po 48 in 72 urah). Če obstajajo podatki, ki kažejo na bistvene razlike v dermalni toksičnosti med moškim in ženskim spolom, se izbere bolj občutljiv spol. Če takih podatkov ni, se lahko uporablja kateri koli spol.

1.4.3 **Pogoji nastanitve in hranjenja**

Temperatura v prostoru za poskuse na živalih naj bo 22 °C(± 3 °C). Čeprav naj bi bila relativna vlažnost vsaj 30 % in naj po možnosti ne bi presegala 70 %, razen med čiščenjem prostora, bi cilj moral biti 50–60 %. Osvetlitev naj bo umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana, ki naj bo prosto na voljo, skupaj z neomejeno količino pitne vode. Med študijo in po možnosti tudi med aklimatizacijo so živali nameščene v presnovnih kletkah posamično. Ker bi razlitje hrane in vode ogrozilo rezultate, je treba verjetnost takih dogodkov čim bolj zmanjšati.

1.4.4 **Priprava živali**

Živali se označijo zaradi posamezne identifikacije in zadržujejo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije zaradi aklimatizacije na laboratorijske pogoje.

Po preteku obdobja aklimatizacije in približno 24 ur pred odmerjanjem se vsaka žival obrije na ramenskem predelu in hrbtu. Prepustnost je pri poškodovani drugačna kot pri nedotaknjeni, zato je treba paziti, da se koža ne odrgne. Po opravljenem britju in približno 24 ur pred nanosom preskusne snovi na kožo (glej oddelek 1.4.7) je treba površino kože očistiti z acetonom, da se odstrani maščoba. Dodatno umivanje z milom in vodo ni priporočljivo, saj lahko vsak ostanek mila pospeši absorpcijo preskusne snovi. Površina mora biti dovolj velika, da omogoči zanesljive izračune absorbirane količine preskusne kemikalije na cm kože, po možnosti vsaj 10 cm . Taka površina je možna pri podganah s telesno težo 200-250 g. Po pripravi se živali vrnejo v presnovne kletke.

1.4.5 **Preskusna snov**

Preskusna snov je snov, katere penetracijske značilnosti se preučujejo. V idealnem primeru naj bi bila preskusna snov označena z radioaktivnim izotopom.

1.4.6 **Preskusni pripravek**

Pripravek preskusne snovi (npr. čist, razredčen ali sestavljen material, ki vsebuje preskusno kemikalijo, ki se nanese na kožo) naj bo enak (ali realističen nadomestek) tistemu, kateremu so izpostavljeni ljudje ali druge možne ciljne vrste. Vsako odstopanje od pripravka, ki se uporablja v praksi, mora biti utemeljeno. Po potrebi se preskusna snov raztopi ali razredči v primernem nosilcu. Če je nosilec kaj drugega kot voda, morajo biti znane absorpcijske lastnosti in možno medsebojno vplivanje s preskusno snovjo.

▼B

1.4.7 **Nanos na kožo**

Na površini kože se določi mesto nanosa določene površine. Znana količina preskusnega pripravka se nato enakomerno nanese na površino. Ta količina mora običajno oponašati možno človeško izpostavljenost, tipično 1–5 mg/cm^2 za trdne snovi ali do 10 µl/cm za tekočine. Vse druge količine morajo biti utemeljene s pričakovanimi pogoji uporabe, cilji preučevanja ali fizičnimi lastnostmi preskusnega pripravka. Po nanosu je treba živali preprečiti negovanje tretiranega mesta. Primer tipične naprave je prikazan na Sliki 1. Običajno se mesto nanosa zaščiti z neokluzivno ovojnico (npr. prepustno najlonsko gazo). Pri neprekinjenem nanašanju pa je potrebna okluzija na mestu nanosa. V primeru, da izhlapevanje polhlapnih preskusnih snovi zmanjša stopnjo izkoristka preskusne snovi do nesprejemljive mere (glej tudi oddelek 1.4.10, prvi odstavek), je treba ujeti izhlapelo snov v ogleni filter, ki pokriva napravo za nanos (glej Sliko 1). Pomembno je, da naprava ne poškoduje kože ali absorbira preskusnega pripravka ali reagira z njim. Živali se vrnejo v posamezne presnovne kletke, da se zberejo iztrebki.

1.4.8 **Trajanje izpostavljenosti in jemanje vzorcev**

Trajanje izpostavljenosti je časovni razmik med nanosom in odstranitvijo preskusnega pripravka z izpiranjem kože. Uporablja naj se ustrezno obdobje izpostavljenosti (tipično 6 ali 24 ur) na podlagi pričakovanega trajanja izpostavljenosti človeka. Po preteku obdobja izpostavljenosti se živali zadržijo v presnovnih kletkah do načrtovane usmrtitve. Živali je treba opazovati zaradi znakov toksičnosti/nenormalnih reakcij v rednih časovnih razmikih med celotnim trajanjem študije. Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba pregledati obdelano kožo zaradi vidnih znakov razdraženosti.

Presnovne kletke morajo omogočati ločeno zbiranje urina in iztrebkov med celo študijo. Omogočati morajo tudi zbiranje ^{14}C-ogljikovega dioksida in hlapnih ^{14}C-ogljikovih spojin, ki se analizirajo, če so prisotne v večji količini (> 5 %). Urin, iztrebke in ujete tekočine (npr. ^{14}C-ogljikov dioksid in hlapne ^{14}C-spojine) je treba zbirati ločeno za vsako skupino ob vsakem času vzorčenja. Če obstaja dovolj podatkov, da se ustvarja malo ali nič hlapnih radioaktivnih metabolitov, se lahko uporabljajo odprte kletke.

Iztrebki se zbirajo med obdobjem izpostavljenosti, do 24 ur po prvem stiku s kožo in nato dnevno do konca poskusa. Medtem ko so trije časovni razmiki za zbiranje iztrebkov običajno dovolj, pa lahko, glede na predviden namen preskusnega pripravka ali obstoječe kinetične podatke, pridejo v poštev tudi bolj ustrezni ali dodatni trenutki za študijo.

Ob koncu obdobja izpostavljenosti se z vsake živali odstrani zaščitna naprava in ločeno shrani za analizo. Obdelano kožo vseh živali je treba vsaj trikrat izprati s čistilnim sredstvom z ustreznimi brisi. Paziti je treba, da se ne okužijo drugi deli telesa. Uporabi naj se čistilno sredstvo, ki je tipično za običajno telesno higieno, npr. milnica. Na koncu se kožo osuši. Vse brise in kar se izpere je treba shraniti za analizo. Za zaščito obdelanega mesta tistih živali, ki sestavljajo skupine za kasnejše časovne točke, je treba pred njihovo vrnitvijo v posamezne kletke uporabiti svežo ovojnico.

▼B

1.4.9 **Zaključni postopki**

Za vsako skupino je treba posamezne živali usmrtiti ob določenem času in zbrati kri za analizo. Zaščitno napravo ali ovojnico je treba odstraniti za analizo. Kožo z mesta nanosa in podobne površine, na katero ni bil nanesen odmerek, vendar je bila pobrita, je treba odstraniti z vsake živali za ločeno analizo. Mesto nanosa se lahko frakcionira, da se loči *stratum corneum* od podležečega epidermisa zaradi zagotavljanja več podatkov o stanju preskusne kemikalije. Ugotavljanje tega stanja v času po obdobju izpostavljenosti bi moralo pokazati usodo vseh preskusnih kemikalij v *stratum corneum*. Zaradi omogočanja frakcioniranja kože (po končnem izpiranju kože in usmrtitvi živali) se odstrani vsaka zaščitna ovojnica. Mesto nanosa na kožo in še krožni predel okoli njega se izreže s podgane in pripne na desko. Kos lepilnega traku se rahlo pritisne na površino kože in odstrani skupaj z delom *stratum corneum*. To se nadaljuje, dokler se trak več ne prilepi na površino kože, ko je odstranjen ves *stratum corneum*. Za vsako žival se trakovi lahko kombinirajo v eni posodi, v katero se doda sredstvo za razgradnjo tkiv, da raztopi *stratum corneum*. Vsa morebitna ciljna tkiva se lahko odstranijo za ločeno merjenje, preden se opravi analiza absorbiranega odmerka v preostanku trupa. Trupe posameznih živali je treba shraniti za analizo. Ponavadi zadostuje analiza celotne vsebine. Ciljni organi se lahko odstranijo za ločeno analizo (če to nakazujejo druge študije). Urin v mehurju ob določeni usmrtitvi se doda prejšnji količini urina. Po odvzemu iztrebkov iz presnovnih kletk ob času, določenem za usmrtitev, je treba kletke in lovilne posode izprati z ustreznim topilom. Prav tako je treba analizirati drugo morebitno kontaminirano opremo.

1.4.10 **Analiza**

Pri vseh študijah je treba doseči zadosten izkoristek (tj. povprečje 100 ± 10 % > radioaktivnosti). Izkoristke izven tega obsega je treba utemeljiti. Količino uporabljenega odmerka v vsakem vzorcu je treba analizirati po ustrezno potrjenih postopkih.

Statistični podatki morajo vključevati določeno mero odstopanj za ponovitve vsakega nanosa.

2. **PODATKI**

Za vsako žival je treba ob vsakem času vzorčenja za preskusno kemikalijo in/ali metabolite opraviti naslednje meritve. Poleg posameznih podatkov je treba poročati o povprečju podatkov, urejenih v skupine po času vzorčenja.

— količina, povezana z zaščitnimi napravami,

— količina, ki se odstrani s kože,

— količina v/na koži, ki je ni mogoče izprati s kože,

▼B

— količina v vzorcu krvi,

— količina v iztrebkih in izdihanem zraku (če je ustrezno),

— količina, ki ostane v trupu in organih, odstranjenih za ločeno analizo.

Količina preskusne snovi in/ali metabolitov v iztrebkih, izdihanem zraku, krvi in v trupu omogoča določanje celotne absorbirane količine v vsaki časovni točki. Izračuna se lahko tudi količina preskusne kemikalije, absorbirane na cm kože, izpostavljene preskusni snovi v obdobju izpostavljenosti.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati zahteve, določene v protokolu, vključno z utemeljitvijo uporabljenega sistema preskusa, ter tudi naslednje:

Preskusna snov:

— identifikacijski podatki [npr. številka CAS, če je na voljo; vir; čistost (radiokemijska čistost); znane nečistoče; serijska številka]

— agregatno stanje, fizikalno-kemijske lastnosti (npr. pH, hlapnost, topnost, stabilnost, molekulska masa in log Pow).

Preskusni pripravek:

— pripravek in utemeljenost uporabe,

— podrobnosti preskusnega pripravka, količina nanosa, dosežena koncentracija, nosilec, stabilnost in homogenost.

Preskusna žival:

— uporabljena vrsta/linija,

— število, starost in spol živali,

— vir živali, namestitveni pogoji, prehrana, itd.,

— teže posameznih živali ob začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— podrobnosti uporabe preskusnega pripravka (mesto nanosa, preskusne metode, zaprtost/nezaprtost, prostornina, ekstrakcija, zaznavnost),

— podrobnosti kakovosti hrane in vode.

Rezultati:

— kakršni koli znaki toksičnosti,

— tabelirani absorpcijski podatki (izraženi kot hitrost, količina in odstotek),

▼B

— celotni izkoristek poskusa,

— razlaga rezultatov, primerjava z razpoložljivimi podatki o absorpciji skozi kožo preskusne spojine.

Razprava o rezultatih.

Sklepi.

4. **LITERATURA**

(1) Preskusna metoda B.45. Absorpcija skozi kožo: Metoda *in vitro*.

(2) OECD (2002). Napotki za izvajanje študij o absorpciji skozi kožo. OECD, Pariz.

(3) ECETOC (1993) Perkutana absorpcija. Evropski center za ekotoksikologijo in toksikologijo kemikalij, Monografija št. 20.

(4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.

(5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

(6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

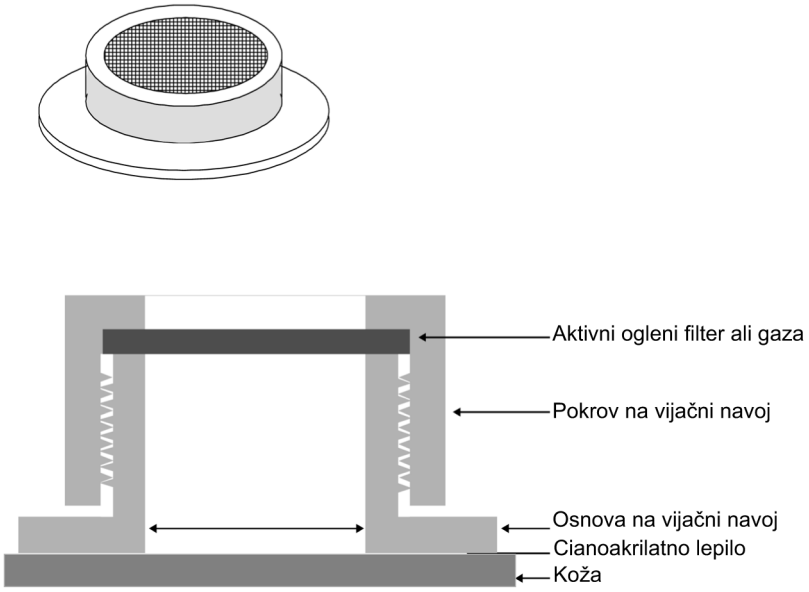
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

Slika 1

Primer oblike značilne naprave, ki se uporablja za določanje in zaščito dermalnega mesta nanosa med *in vivo* študijami perkutane absorpcije



▼B

B.45 ABSORPCIJA SKOZI KOŽO: METODA *IN VITRO*

1. METODA

Ta preskusna metoda je enakovredna OECD TG 428 (2004).

1.1 UVOD

Ta metoda je bila oblikovana za zagotavljanje informacij o absorpciji preskusne snovi, nanesene na izrezano kožo. Lahko se kombinira z metodo za absorpcijo skozi kožo: metodo *in vivo* (1), ali pa se opravi ločeno. Priporočljivo je, da se preverijo Napotki OECD za izvajanje študij o absorpciji skozi kožo (2), kot pomoč pri oblikovanju študij, ki temeljijo na tej metodi. Napotki so bili pripravljeni, da bi omogočili izbiro ustreznih *in vitro* postopkov za uporabo v posebnih okoliščinah, zaradi zagotavljanja zanesljivosti rezultatov, pridobljenih s to metodo.

Metode za merjenje absorpcije skozi kožo in dermalne dostave so razdeljene v dve kategoriji: *in vivo* ter *in vitro.* Metode absorpcije skozi kožo *in vivo* so zelo uveljavljene in zagotavljajo farmakokinetične informacije pri številnih živalskih vrstah. Metoda *in vivo* je opisana posebej v drugi preskusni metodi (1). Metode *in vitro* se tudi že dolgo uporabljajo za merjenje absorpcije skozi kožo. Čeprav formalne validacijske študije metod *in vitro,* ki so zajete v to preskusno metodo, niso bile opravljene, so se strokovnjaki OECD leta 1999 dogovorili, da je v podporo metodi *in vitro* (3) ovrednotenih dovolj podatkov. Dodatni podrobni podatki, ki krepijo to podporo, vključno s pomembnim številom neposrednih primerjav med metodama *in vitro* ter *in vivo,* so zagotovljeni v Napotkih (2). Ta tema je obravnavana v številnih monografijah, ki tudi navajajo podrobno ozadje uporabe metode *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Z metodami *in vitro* se meri difuzija kemikalij v kožo in po koži v posodo s tekočino, uporablja pa se lahko neaktivna koža za merjenje samo difuzije, ali sveža, presnovno aktivna koža za istočasno merjenje difuzije in kožne presnove. Take metode so postale posebno uporabne kot sito za primerjanje dostave kemikalij iz različnih pripravkov v in skozi kožo, lahko pa so tudi uporabni modeli za ocenjevanje absorpcije skozi kožo pri človeku.

Metode *in vitro* ni mogoče uporabljati za vsa stanja in razrede kemikalij. Preskusno metodo *in vitro je* mogoče uporabljati za začetno kakovostno presojo penetracije skozi kožo. V določenih primerih je treba to metodo dopolniti s podatki iz metode *in vivo.* Za nadaljnjo razčlenitev stanj, v katerih bi bila metoda *in vitro* ustrezna, je treba preveriti napotke (2). Dodatne podrobne informacije v podporo odločitvi so na voljo v (3).

Ta metoda predstavlja splošna načela merjenja dermalne absorpcije in dostave preskusne snovi pri uporabi izrezane kože. Uporablja se lahko koža več vrst sesalcev, vključno s človekom. Značilnosti prepustnosti kože se po odstranitvi s teles ohranjajo, ker je glavna difuzij ska pregrada neaktivna *stratum corneum;* aktivni prenos kemikalij skozi kožo ni identificiran. Pokazalo se je, da ima koža zmožnost presnavljanja nekaterih kemikalij med perkutano absorpcijo (6), vendar ta postopek ne omejuje hitrosti dejansko absorbiranega odmerka, čeprav lahko vpliva na naravo snovi, ki vstopa v krvni obtok.

▼B

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Neabsorbirani odmerek: pomeni odmerek, izpran s površine kože po izpostavljenosti in vsak odmerek, prisoten na neokluzivni ovojnici, vključno z vsakim odmerkom, ki bo izhlapel iz kože med izpostavljenostjo.

Absorbirani odmerek *(in vitro):* masa preskusne snovi, ki pride do receptorske tekočine ali obtoka v sistemu v določenem časovnem obdobju.

Absorpcijski odmerek *(in vitro):* pomeni odmerek, prisoten na ali v koži po izpiranju.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskusno snov, ki je lahko označena z radioaktivnim izotopom, se nanese na površino vzorca kože, ki ločuje dve komori difuzijske celice. Kemikalija določen čas in pod določenimi pogoji ostane na koži, preden se odstrani po ustreznem postopku čiščenja. Receptorska tekočina se v časovnih točkah vzorči med celotnim poskusom in analizirajo se preskusne kemikalije in/ali metaboliti.

Če se uporabljajo presnovno aktivni sistemi, se z ustreznimi metodami lahko analizirajo metaboliti preskusnih kemikalij. Na koncu poskusa se v celoti oceni razdelitev preskusnih kemikalij in njihovih metabolitov, kadar je ustrezno.

Absorpcija preskusne snovi se meri v določenem časovnem obdobju pri ustreznih pogojih, ki so opisani v tej metodi in v napotkih (2), z analizo receptorske tekočine in obdelane kože. Za preskusno snov, ki ostane v koži, se šteje, da je absorbirana, razen če je mogoče pokazati, da se absorpcija lahko določi le iz vrednosti receptorske tekočine. Analiza drugih elementov (snovi, izprane s kože, ki ostane v plasteh kože) omogoča dodatno ovrednotenje podatkov, vključno s celotno razpoložljivostjo preskusne snovi in odstotkom izkoristka.

Za prikaz uspešnosti in zanesljivosti preskusnega sistema v izvajalnem laboratoriju, bi morali biti rezultati za ustrezne referenčne kemikalije na voljo in v skladu z objavljeno literaturo za uporabljeno metodo. To zahtevo je mogoče izpolniti s testiranjem ustrezne referenčne snovi (po možnosti z lipofilnostjo, ki je blizu preskusni snovi) hkrati s preskusno snovjo ali z zagotavljanjem dovolj preteklih podatkov za številne referenčne snovi z različno lipofilnostjo (npr. kofein, benzojska kislina in testosteron).

1.4 OPIS PRESKUSNE METODE

1.4.1 **Difuzijska celica**

Difuzijska celica je sestavljena iz donorske in receptorske komore, med katere se namesti koža (tipični primer je prikazan na Sliki 1). Celica mora zagotoviti dobro zaščito okoli kože, omogočiti enostavno vzorčenje in dobro mešanje receptorske raztopine v stiku s spodnjo stranjo kože ter dober temperaturni nadzor celice in njene vsebine. Sprejemljive so statične in pretočne difuzijske celice. Običajno na donorskih komorah med izpostavljenostjo končnemu odmerku preskusnega pripravka ni okluzije. Pri neprekinjenem nanašanju in pri določenih potekih pri končnih odmerkih pa je okluzija na na donorskih komorah lahko potrebna.

▼B

1.4.2 **Receptorska tekočina**

Uporaba fiziološko prevodne receptorske tekočine je bolj zaželena, čeprav se lahko uporabljajo tudi druge, če so utemeljene. Dana mora biti natančna sestava receptorske tekočine. Zagotovljena mora biti zadostna topnost preskusne kemikalije v receptorski tekočini, tako da ne deluje kot pregrada za absorpcijo. Poleg tega receptorska tekočina ne sme vplivati na neoporečnost kožnega pripravka. V pretočnem sistemu hitrost pretoka ne sme ovirati difuzije preskusne snovi v receptorsko tekočino. V sistemu statične celice je treba tekočino neprestano mešati in redno jemati vzorce. Če se preučuje presnova, mora receptorska tekočina podpirati aktivnost kože med celotnim poskusom.

1.4.3 **Kožni pripravki**

Uporablja se lahko človeška ali živalska koža. Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in okoliščine. Čeprav je bolj zaželena aktivna koža, se lahko uporablja tudi neaktivna koža, če je mogoče dokazati njeno neoporečnost. Sprejemljive so bodisi epidermalne membrane (encimsko, toplotno ali kemijsko ločene) ali koža z razcepljeno debelino (tipično debela 200-400 μm), pripravljena z dermatomom. Lahko se uporablja koža s celotno debelino, vendar se je treba izogibati prekomerni debelini (ca. > 1 mm), razen če je izrecno potrebna za določanje preskusnih kemikalij v plasteh kože. Izbira vrst, anatomsko mesto in tehnika pripravljanja morajo biti utemeljeni. Potrebni so sprejemljivi podatki iz najmanj štirih ponovitev na preskusni pripravek.

1.4.4 **Neoporečnost kožnega pripravka**

Bistveno je, da je koža pravilno pripravljena. Neustrezno ravnanje lahko poškoduje *stratum corneum,* zato je treba preveriti neoporečnost pripravljene kože. Kadar se preiskuje presnova kože, je treba sveže izrezano kožo uporabiti čim hitreje in pod pogoji, ki podpirajo presnovno dejavnost. Na splošno naj bo sveže izrezana koža uporabljena v 24 urah, sprejemljivo obdobje skladiščenja pa je lahko različno glede na encimski sistem presnavljanja in temperature skladiščenja (13). Če so kožni pripravki pred uporabo skladiščeni, je treba podati dokaze, ki izkazujejo ohranjanje pregradne funkcije.

1.4.5 **Preskusna snov**

Preskusna snov je snov, katere penetracijske značilnosti se preučujejo. V idealnem primeru naj bi bila preskusna snov označena z radioaktivnim izotopom.

1.4.6 **Preskusni pripravek**

Pripravek preskusne snovi (npr. čist, razredčen ali sestavljen material, ki vsebuje preskusno snov, ki se nanese na kožo) naj bo enak (ali realističen nadomestek) tistemu, kateremu so izpostavljeni ljudje ali druge možne ciljne vrste. Vsako odstopanje od pripravka, ki se uporablja v praksi, mora biti utemeljeno.

▼B

1.4.7 **Koncentracije in izdelave pripravkov preskusnih snovi**

Običajno se uporablja več kot ena koncentracija preskusne snovi, da zajema zgornjo možno izpostavljenost človeka. Enako je treba upoštevati razpon preskušanja značilnih pripravkov.

1.4.8 **Nanos na kožo**

Pod normalnimi pogoji izpostavljenosti človeka kemikalijam gre ponavadi za končne odmerke. Zato je treba uporabiti nanos, ki oponaša izpostavljenost človeka, običajno 1-5 mg/cm^2 kože za trdne snovi in do 10 $\mu l/cm^2$ za tekočine. Količina mora biti utemeljena s pričakovanimi pogoji uporabe, cilji preučevanja ali fizičnimi lastnostmi preskusnega pripravka. Nanosi na površino kože so lahko, na primer, neprekinjeni, če se nanašajo veliki volumni na enoto površine.

1.4.9 **Temperatura**

Na pasivno difuzijo kemikalij (in zato njihovo absorpcijo skozi kožo) vpliva temperatura. Difuzijsko komoro in kožo je treba ohranjati pri konstantni temperaturi, ki je blizu normalni temperature kože, to je 32 – 1 ^oC. Različne oblike celic zahtevajo različne temperature vodne kopeli ali toplotnih blokov, da se zagotavlja fiziološka norma receptorja/kože. Vlažnost naj bo po možnosti od 30 do 70 %.

1.4.10 **Trajanje izpostavljenosti in jemanje vzorcev**

Koža je lahko izpostavljena preskusnemu pripravku med celotnim poskusom ali krajši čas (tj., zaradi oponašanja določene vrste izpostavljenosti človeka). S kože je treba z ustreznim čistilnim sredstvom izprati odvečni preskusni pripravek in preostanek zbrati za analizo. Postopek odstranjevanja preskusnega pripravka je odvisen od pogoja pričakovane uporabe in ga je treba utemeljiti. Običajno se zahteva obdobje vzorčenja 24 ur za omogočanje zadostne karakterizacije absorpcijskega profila. Ker se neoporečnost kože lahko začne slabšati po 24 urah, čas vzorčenja običajno ne sme presegati 24 ur. Za preskusne snovi, ki hitro prodrejo v kožo, to ni potrebno, za preskusne snovi, ki prodirajo počasi, pa je lahko potreben daljši čas. Pogostost vzorčenja receptorske tekočine mora omogočati grafično predstavitev absorpcijskega profila preskusne snovi.

1.4.11 **Zaključni postopki**

Vse elemente sistema preskusa je treba analizirati in določiti izkoristek. To obsega donorsko komoro, izpiranje površine kože, kožni pripravek in receptorsko komoro/komoro s tekočino. V nekaterih primerih se koža lahko frakcionira na izpostavljeno površino kože in površino kože pod celičnim robom ter na *stratum corneum,* epidermis in dermis fractions za ločeno analizo.

1.4.12 **Analiza**

Pri vseh študijah je treba doseči zadosten izkoristek (cilj bi moral biti povprečje 100 – +/-10 % radioaktivnosti in vsaka odstopanja morajo biti utemeljena). Količino preskusne snovi v receptorski tekočini, kožni pripravek, izpiranja s površine kože in kar se izpere z aparature je treba z ustrezno tehniko analizirati.

▼B

2. **PODATKI**

Predstaviti je treba analizo receptorske tekočine, distribucijo kemikalij preskusne snovi v sistemu preskusa in absorpcijski profil glede na čas. Kadar se uporabljajo pogoji izpostavljenosti končnemu odmerku, je treba izračunati količino, izprano s kože, količino, povezano s kožo (in v različnih plasteh kože, če se analizira) in količino, prisotno v receptorski tekočini (stopnjo in količino ali odstotek nanesenega odmerka). Včasih je absorpcija skozi kožo lahko izražena le s podatki o receptorski tekočini. Če pa preskusna snov ostane v koži ob koncu študije, jo je treba vključiti v skupno absorbirano količino (glej odstavek 66 glede na (3)). V pogojih neprekinjene izpostavljenosti odmerku lahko podatki omogočajo izračun prepustnostne konstante (Kp). V teh pogojih delež absorpcije ni pomemben.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati zahteve, določene v protokolu, vključno z utemeljitvijo uporabljenega sistema preskusa, ter tudi naslednje:

Preskusna snov:

— agregatno stanje, fizikalno-kemijske lastnosti (vsaj molekulska masa in log Pow), čistost (radiokemijska čistost),

— identifikacijski podatki (npr. serijska številka),

— topnost v receptorski tekočini.

Preskusni pripravek:

— pripravek in utemeljenost uporabe,

— homogenost.

Preskusni pogoji:

— viri in mesto kože, metoda priprave, pogoji shranjevanja pred uporabo, vsa predhodna obdelava (čiščenje, zdravljenje z antibiotiki, itd.), merjenja neoporečnosti kože, presnovni status, utemeljitev uporabe,

— oblika celice, sestava receptorske tekočine, pretok receptorske tekočine, ali časi in postopki vzorčenja,

— podrobnosti nanosa preskusnega pripravka in količinska opredelitev nanesenega odmerka,

— trajanje izpostavljenosti,

— podrobnosti odstranitve preskusnega pripravka s kože, npr. izpiranje kože,

— podrobnosti analize kože in vse tehnike frakcioniranja, uporabljene za prikaz porazdelitve kože,

▼B

— postopki čiščenja celice in opreme,

— preskusna metoda, tehnike ekstrakcije, meje zaznavnosti in validacija analitične metode.

Rezultati:

— celotni izkoristek poskusa (naneseni odmerek = izpiranja s kože + koža + receptorska tekočina + izpiranja s celice),

— tabeliranje posameznih celičnih izkoristkov v vsakem prostoru,

— absorpcijski profil,

— tabelirani absorpcijski podatki (izraženi kot hitrost, količina in odstotek).

Razprava o rezultatih.

Sklepi.

4. **LITERATURA**

(1) Preskusna metoda B.44. Absorpcija skozi kožo: Metoda *in vivo.*

(2) OECD (2002). Napotki za izvajanje študij o absorpciji skozi kožo. OECD, Pariz.

(3) OECD (2000). Poročilo s sestanka Razširjenega pripravljalnega odbora OECD za preskušanje perkutane absorpcije, Priloga 1 k ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Pariz.

(4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

(7) Evropski center za ekotoksikologijo in toksikologijo kemikalij (1993). Monografija št.. 20, Perkutana absorpcija, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for In *Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*\. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

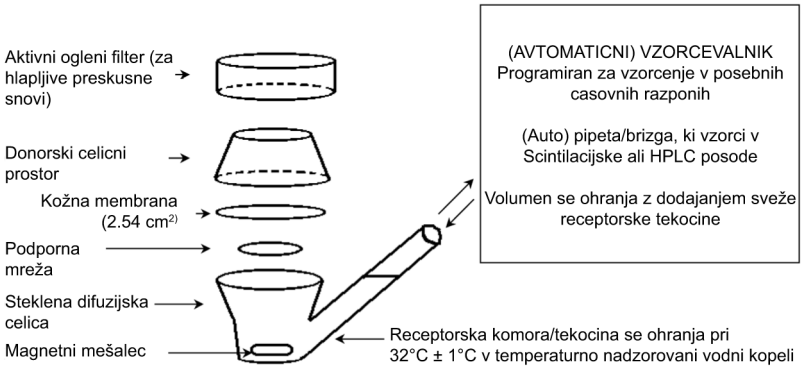
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C, Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Slika 1

Primer značilne oblike statične difuzijske celice za študije perkutane absorpcije *in vitro*



▼M8

B.46 PRESKUS DRAŽENJA KOŽE *IN VITRO*: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 439 (2015). Draženje kože pomeni nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]). Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in vitro*, ki se lahko uporablja za opredeljevanje nevarnosti dražilnih kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP (2). V regijah, ki niso sprejele neobvezne kategorije 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi), se lahko ta preskusna metoda uporabi tudi za opredelitev nerazvrščenih kemikalij. Zato se lahko – odvisno od regulativnega okvira in uporabljenega sistema razvrščanja – ta preskusna metoda uporablja za ugotavljanje dražilnosti kemikalij za kožo kot samostojen nadomestni preskus za preskušanje draženja kože *in vivo* ali kot delni nadomestni preskus v okviru strategije preskušanja (3).

2. Ocena draženja kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (4). Za preskušanje jedkosti so bile tri validirane preskusne metode *in vitro* sprejete kot preskusna metoda EU B.40 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 430), preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (5) (6) (7). V dokumentu o smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (3).

3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka draženje kože z vidika zdravja ljudi. Temelji na preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice *in vitro*, ki ima zelo podobne biokemijske in fiziološke značilnosti kot zgornji deli človeške kože, tj. pokožnica. Pri preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice se netransformirani keratinociti pokožnice iz človeškega tkiva uporabijo kot vir celic za rekonstrukcijo modela pokožnice z reprezentativno histologijo in citoarhitekturo. Na voljo so standardi izvajanja, da se olajšata validacija in ocena podobnih in spremenjenih preskusnih metod, temelječih na rekonstruirani človeški pokožnici, v skladu z načeli iz Smernice OECD 34 (8) (9). Ustrezna smernica za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2010, leta 2013 je bila posodobljena zaradi vključitve dodatnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in uvedbe uporabe alternativnega postopka za merjenje viabilnosti.

4. Predvalidacijske, optimizacijske in validacijske študije so bile dokončane za štiri preskusne modele *in vitro*, ki so na voljo na trgu (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) in temeljijo na preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice (80-odstotna občutljivost, 70-odstotna specifičnost in 75-odstotna točnost). Ti štirje preskusni modeli so vključeni v to preskusno metodo in navedeni v

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M8

Dodatku 2, ki vsebuje tudi informacije o vrsti validacijske študije, uporabljeni za validacijo posamezne preskusne metode. Kot je opozorjeno v Dodatku 2, je bila za razvoj te preskusne metode in standardov izvajanja uporabljena validirana referenčna metoda (VRM) (8).

5. Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno le za preskusne modele, validirane v skladu s standardi izvajanja (8), če je te preskusne modele pregledala in sprejela OECD. Preskusni modeli, vključeni v to preskusno metodo, in ustrezne smernice OECD za preskušanje se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav po rezultatih preskusov iz preskusnih metod dražilnosti za kožo *in vitro*, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov.

6. Opredelitve pojmov, uporabljenih v tem dokumentu, so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

7. Omejitev preskusne metode, kot jo je pokazala celovita prospektivna validacijska študija, s katero so se ocenile in opredelile preskusne metode rekonstruirane človeške pokožnice (16), je, da ne omogoča razvrščanja kemikalij v neobvezno kategorijo 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1). Tako bo način uporabe te preskusne metode odvisen od regulativnega okvira v državah članicah. Za EU v uredbi CLP ni bila uvedena kategorija 3. Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti dokument s smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (3). Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in pogoji.

8. S to preskusno metodo se obravnava končna točka draženje kože z vidika zdravja ljudi. Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o jedkosti za kožo, je treba opozoriti, da preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) v zvezi z jedkostjo za kožo temelji na istem preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, čeprav uporablja drug protokol (6). Ta preskusna metoda temelji na modelih rekonstruirane človeške pokožnice, ki uporabljajo človeške keratinocite in tako predstavljajo *in vitro* ciljni organ želene vrste. Poleg tega neposredno vključuje prvo stopnjo kaskadne reakcije vnetja/mehanizma delovanja (poškodba celic in tkiva, posledica pa je lokalizirana poškodba), do katere pride med draženjem *in vivo*. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, so bile preskušene številne kemikalije, v zbirko podatkov validacijske študije pa je skupno vključenih 58 kemikalij (16) (18) (23). Ta preskusna metoda se uporablja za trdne snovi, tekočine, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijski študiji (29). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

9. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr.

▼M8

v skladu s strategijo, kot jo predlagajo Eskes *et al.*, 2012) (30), ne sme uporabljati za to posamezno kategorijo zmesi. Podobna previdnost je potrebna, če se za določene kemijske razrede ali fizikalno-kemijske lastnosti ugotovi, da se ne uporabljajo za to preskusno metodo.

10. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v enakem razponu kot formazan MTT, in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (glede na formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti celic, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole (glej odstavke 28–34).

11. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz treh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni delež viabilnosti, enak 50 ± 5 %, pa je morda treba preučiti drugo preskušanje in nato še tretje, če so rezultati prvih dveh preskušanj neskladni.

NAČELO PRESKUSA

12. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite človeške pokožnice, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.

13. S kemikalijami izzvano draženje kože, ki se pokaže predvsem v obliki rdečine in otekline, je rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem kemikalij skozi roženo plast, kjer lahko poškodujejo spodaj ležeče plasti keratinocitov in drugih kožnih celic. Poškodovane celice bodisi sprostijo vnetne posrednike bodisi sprožijo kaskadne reakcije vnetja, ki deluje tudi na celice v usnjici, zlasti na celice strome in endotelne celice krvnih žil. Zaradi razširitve in povečane prepustnosti endotelnih celic nastaneta opazna rdečina in oteklina (29). S preskusnimi metodami na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice se zaradi neobstoja kakršne koli vaskularizacije v preskusnem sistemu *in vitro* merijo zlasti začetni dogodki v kaskadni reakciji, npr. poškodbe celic/tkiv (16) (17), pri čemer se kot odčitek uporablja celična viabilnost.

14. Viabilnost celic v modelih rekonstruirane človeške pokožnice se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro; številka CAS 298–93-1) v soli modrega formazana, katere količina se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (31). Dražilne kemikalije se opredelijo glede na njihovo zmožnost zmanjšanja viabilnosti celic pod opredeljene vrednosti praga (tj. ≤ 50 %, za kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP). Odvisno od regulativnega okvira in uporabnosti preskusne metode se lahko preskusne kemikalije, ki vplivajo na viabilnost celic nad opredeljeno vrednostjo praga, štejejo za nedražilne snovi (tj. > 50 %, brez kategorije).

▼M8

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

15. Pred redno uporabo katerega koli od štirih validiranih preskusnih modelov, ki izpolnjujejo zahteve te preskusne metode (Dodatek 2), morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. V primerih, ko snov s seznama na primer ni na voljo, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (8)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1. Uporabo druge snovi za preverjanje usposobljenosti je treba utemeljiti.

16. V okviru preskušanja usposobljenosti je priporočljivo, da uporabniki po prejetju preverijo pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskusna metoda uspešno vzpostavljena ter je pridobljena in dokazana usposobljenost za njeno uporabo, tako redno preverjanje ni več potrebno. Vendar je priporočljivo, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

Preglednica 1

Snovi za preverjanje usposobljenosti ([1])

Snov	ŠT. CAS	Rezultat *in vivo* ([2])	Agregatno stanje	Kategorija po GHS ZN
NERAZVRŠČENE SNOVI (brez kategorije po GHS ZN)				
Naftalen ocetna kislina	86-87-3	0	trdno	brez kat.
Izopropanol	67-63-0	0,3	tekoče	brez kat.
Metil stearat	112-61-8	1	trdno	brez kat.
Heptil butirat	5870-93-9	1,7	tekoče	brez kat. (*neobvezna kat. 3*) ([3])
Heksil salicilat	6259-76-3	2	tekoče	brez kat. (*neobvezna kat. 3*) ([3])
RAZVRŠČENE SNOVI (kategorija 2 po GHS ZN)				
Ciklamen aldehid	103-95-7	2,3	tekoče	kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	2,7	tekoče	kat. 2
Kalijev hidroksid (5-odstotni vodni)	1310-58-3	3	tekoče	kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	trdno	kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	tekoče	kat. 2

([1]) Snovi za preverjanje usposobljenosti so podskupina snovi, ki se uporabljajo v validacijski študiji, njihova izbira pa temelji na naslednjih merilih: (i) kemikalije so na voljo na trgu; (ii) predstavljajo celoten niz rezultatov Draizovega preskusa draženja kože (od nedražilnih do zelo dražilnih); (iii) njihova kemična struktura je natančno opredeljena; (iv) predstavljajo kemijsko delovanje, ki je uporabljeno v validacijskem postopku; (v) zagotovile so ponovljive rezultate *in vitro* pri večkratnih preskušanjih in v več laboratorijih; (vi) pravilno so bile napovedane *in vitro* ter (vii) se ne povezujejo z zelo toksičnim profilom (npr. rakotvornim ali toksičnim za reprodukcijski sistem) ali previsokimi stroški odstranjevanja.

([2]) Rezultat *in vivo* v skladu s preskusno metodo B.4 (4).

([3]) V okviru te preskusne metode se neobvezna kategorija 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1) šteje kot „Brez kategorije“.

▼M8

POSTOPEK

17. V nadaljevanju so opisani elementi in postopki za oceno razdraženosti kože s preskusno metodo rekonstruirane človeške pokožnice (glej tudi Dodatek 3 za parametre, povezane z vsakim preskusnim modelom). Na voljo so standardni delovni postopki za vse štiri modele, ki ustrezajo tej preskusni metodi (32) (33) (34) (35).

ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

Splošni pogoji

18. Za rekonstrukcijo epitelija je treba uporabiti netransformirane človeške keratinocite. Pod funkcionalno roženo plastjo mora biti več slojev živih epitelijskih celic (bazalna plast, trnasta plast, zrnata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC_{50}), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % (ET_{50}) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije. Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečevati prehod materiala okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali gliv.

Pogoji za funkcionalnost

Viabilnost

19. Analiza, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti, je analiza MTT (31). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruirane človeške pokožnice lahko reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. OD < 0,1. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (OD) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (36). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (v pogojih preskusne metode za draženje kože) določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za štiri validirane modele rekonstruirane človeške pokožnice, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. Evidentirati je treba, da so tkiva, tretirana z negativno kontrolo, obstojna v kulturi (meritve viabilnosti so podobne) med celotnim trajanjem preskusnega obdobja izpostavljenosti.

Preglednica 2

Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Pregradna funkcija

20. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. SDS ali Tritona X-100, kot se ocenjuje z IC_{50} ali ET_{50} (preglednica 3).

Morfologija

21. Zagotovljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz strukture, podobne človeški pokožnici (vključno z večplastno roženo plastjo).

Obnovljivost

22. Rezultati pozitivnih in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazovati obnovljivost v daljšem časovnem obdobju.

Kontrola kakovosti

23. Model rekonstruirane človeške pokožnice se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija modela rekonstruirane človeške pokožnice izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *viabilnost* (odstavek 19), *pregradno funkcijo* (odstavek 20) in *morfologijo* (odstavek 21). Te podatke je treba zagotoviti uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC_{50} ali ET_{50} mora določiti razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Za zanesljivo napoved razvrstitve med dražilne snovi se lahko upoštevajo le rezultati, doseženi z ustreznimi tkivi. Razponi sprejemljivosti za štiri preskusne modele, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3

Merila za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM) (18-urno tretiranje s SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1-odstotni Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 ure	ET_{50} = 8,7 ure
SkinEthic™ RHE (1-odstotni Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ure	ET_{50} = 10,0 ure
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-urno tretiranje s SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij

24. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti vsaj tri ponovljene vzorce. Pri tekočih in trdnih kemikalijah je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije, da se enakomerno prekrije površina pokožnice, pri čemer mora biti odmerek natančno določen, tj. od 26 do 83 µl/cm^2 ali mg/cm^2 (glej Dodatek 3). Za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice je treba v primeru trdnih kemikalij površino pokožnice pred nanosom navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo. Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. V nekaterih primerih se lahko kot pomoč za porazdelitev uporabi najlonska mrežica (glej Dodatek 3). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo skrbno sprati s površine pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Odvisno od uporabljenih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice čas izpostavljenosti traja 15–60 minut, inkubacijska temperatura pa znaša 20–37 °C. Ti časi in temperature izpostavljenosti so optimirani za vsako posamezno preskusno metodo rekonstruirane človeške pokožnice ter predstavljajo različne bistvene lastnosti preskusnih modelov (npr. pregradno funkcijo) (glej Dodatek 3).

25. V vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno (NC) in pozitivno kontrolo (PC), da se dokaže, da so viabilnost celic (pri NC), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiv (pri PC) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana snov za pozitivno kontrolo je 5-odstotni vodni SDS. Predlagani snovi za negativno kontrolo sta voda ali fosfatni pufer s soljo (PBS).

Meritve viabilnosti celic

26. Glede na postopek preskušanja je bistveno, da se viabilnost celic ne meri takoj po izpostavljenosti preskusni kemikaliji, ampak v svežem gojišču po dovolj dolgi inkubacijski dobi po tretiranju izpranega tkiva. Ta čas omogoča izboljšanje stanja, kar zadeva šibke citotoksične vplive, in pojav jasnih citotoksičnih vplivov. Ugotovljeno je bilo, da je 42-urna inkubacijska doba po tretiranju optimalna med optimiranjem preskusa dveh od preskusnih modelov na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice, na katerih temelji ta preskusna metoda (11) (12) (13) (14) (15).

27. Analiza MTT je standardizirana kvantitativna metoda, ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti celic. Ustreza uporabi tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3–1 mg/ml). Viabilne celice MTT pretvorijo v modri formazan. S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se iz tkiva pridobi oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi optična gostota pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ ± 30 nm, ali s postopkom spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavek 34) (36).

28. Optične lastnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko ovirajo analizo (npr. kemikalije lahko preprečijo obarvanje ali povzročijo, da se razlikuje od običajnega, lahko pa ga tudi povzročijo), zaradi česar je lahko ocena viabilnosti celic nepravilna. To se lahko zgodi, če se določena preskusna kemikalija z izpiranjem ne odstrani s kože v celoti ali če prodre v pokožnico. Če preskusna kemikalija deluje neposredno na MTT (npr. snov, ki neposredno zmanjša MTT), je običajne barve ali se obarva med tretiranjem tkiva, je treba izvesti dodatne kontrole, da se zaznajo

▼M8

in odpravijo interference preskusne kemikalije s tehniko za merjenje viabilnosti (glej odstavka 29 in 33). Za podrobnejši opis načina glede popravka neposrednega zmanjšanja MTT in vpliva barvil glej standardne operativne postopke za štiri validirane modele, vključene v to preskusno metodo (32) (33) (34) (35).

29. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati v sveže pripravljeno raztopino MTT. Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo, obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilnih tkivih rekonstruirane človeške pokožnice, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar preskusno kemikalijo absorbirajo podobno kot viabilna tkiva. Vsaka preskusna kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se nato opravi celotni postopek preskušanja, da pride do nespecifične redukcije MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSMTT, ne glede na število izvedenih samostojnih preskusov/ponovitev. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSMTT).

30. Za opredelitev morebitnega vplivanja obarvanih preskusnih kemikalij ali preskusnih kemikalij, ki so se obarvale v stiku z vodo ali izopropanolom, in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, je treba opraviti spektralno analizo preskusne kemikalije v vodi (okolje med izpostavljenostjo) in/ali izopropanolu (raztopina za ekstrahiranje). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira svetlobo v razponu 570 ± 30 nm, je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 33 in 34). Pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD) se vsaka moteča obarvana preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva, na katerih se izvede celotni postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT, da se dobi kontrola z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$). Kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$) je treba izvesti sočasno s preskušanjem obarvane preskusne kemikalije, v primeru večkratnega preskušanja pa je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv za vsak izvedeni preskus (pri vsaki ponovitvi) izvesti neodvisno kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$). Dejanska viabilnost tkiv se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiv, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z gojiščem brez MTT, pri čemer je bil ta preskus izveden sočasno s preskusom, ki se popravlja (% $NSC_{živo}$).

31. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 29) in povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 30), je potreben tudi tretji niz kontrol poleg NSMTT in $NSC_{živo}$, opisanih v prejšnjih odstavkih, ko se izvaja meritev standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki motijo analizo MTT (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira presojo njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je

▼M8

opisana v odstavku 29. Te preskusne kemikalije se lahko vežejo na živa in odmrla tkiva, zato se s kontrolo NSMTT ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi vezave preskusne kemikalije na odmrla tkiva. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo $NSC_{živo}$ že popravi barvna interferenca, ki jo povzroča vezava preskusne kemikalije na živa tkiva. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSC_{odmrlo}). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se izvede celoten postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC_{odmrlo} ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in po možnosti z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odštejeta % NSMTT in % $NSC_{živo}$, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC_{odmrlo}).

32. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc povečajo odčitki izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi mora vsak laboratorij najprej določiti razpon linearnosti svojega spektrofotometra s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7) iz komercialnega vira, šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene. Meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in preskusnih kemikalij, ki povzročajo barvno interferenco, ko so optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, znotraj linearnega razpona spektrofotometra ali ko nepopravljeni delež viabilnosti, dobljen s preskusno kemikalijo, že znaša ≤ 50 %. Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo % NSMTT in/ali % $NSC_{živo}$ ≥ 50 % negativne kontrole, obravnavati previdno, saj je to mejna vrednost, ki se uporablja za razlikovanje med razvrščenimi in nerazvrščenimi kemikalijami (glej odstavek 36).

33. Za obarvane preskusne kemikalije, ki niso združljive z meritvijo standardne absorbance (OD) zaradi premočnega vplivanja na analizo MTT, se lahko uporabi alternativni postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT (glej odstavek 34) (36). Sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC omogoča, da se formazan MTT loči od preskusne kemikalije pred njegovo kvantifikacijo (36). Iz tega razloga kontrole $NSC_{živo}$ ali NSC_{odmrlo} pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT ali da njena barva ovira oceno sposobnosti za neposredno redukcijo MTT (kot je opisano v odstavku 29). Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni

▼M8

kemikaliji, od katerega se odšteje % NSMTT. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter ki ostanejo v tkivih po tretiranju in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušenih izvlečkov tkiv, ki presegajo razpon linearnosti spektrofotometra, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

34. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko uporabi tudi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) za merjenje formazana MTT (36). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC je treba usposobljenost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo v zvezi z bioanalitično metodo validacije (36) (37). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 4. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 4, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in je pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

Merila za sprejemljivost

35. Za vsako preskusno metodo, pri kateri se uporabljajo ustrezne serije modelov rekonstruirane človeške pokožnice (glej odstavek 23), morajo imeti tkiva, tretirana z negativno kontrolo, optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, pri katerih so se upoštevale zahtevane stopnje in vsi postopki protokola. Vrednosti kontrol optične gostote ne smejo biti nižje od v preteklosti postavljenih mej. Podobno mora biti iz tkiv, tretiranih s pozitivno kontrolo, tj. 5-odstotnim vodnim SDS, razvidna sposobnost, da se odzovejo na jedko kemikalijo v pogojih preskusne metode (glej Dodatek 3 in za več informacij standardne operativne postopke štirih preskusnih modelov, vključenih v to smernico za preskušanje (32) (33) (34) (35)). S tem povezane ustrezne meritve variabilnosti med ponovljenimi vzorci tkiv, tj. standardni odkloni, morajo biti znotraj meja sprejemljivosti, določenih za uporabljeni preskusni model (glej Dodatek 3).

Razlaga rezultatov in napovedni model

36. Vrednosti optične gostote, pridobljene z vsako preskusno kemikalijo, se lahko uporabijo za izračun deleža viabilnosti, normaliziranega na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Če se uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot delež površine vrha formazana MTT, dobljene z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, glede na vrh formazana MTT, dobljen s sočasno negativno kontrolo. Mejna vrednost deleža viabilnosti celic, ki dražilne preskusne kemikalije loči od nerazvrščenih, in statistični postopki, ki se uporabljajo za ocenjevanje rezultatov ter določanje dražilnih kemikalij, morajo biti natančno opredeljeni in evidentirani ter dokazani kot ustrezni (za več informacij glej standardne operativne postopke preskusnih modelov). Mejne vrednosti za napoved draženja so podane v nadaljevanju.

▼M8

— Za preskusno kemikalijo se šteje, da jo je treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (kategorija 2 ali kategorija 1), če je povprečni delež viabilnosti tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju manjši ali enak (≤) 50 %. Ker s preskusnimi modeli rekonstruirane človeške pokožnice, ki so zajeti s to preskusno metodo, ni mogoče razlikovati med kategorijama 1 in 2 po GHS ZN/uredbi CLP, je za končno razvrstitev preskusne kemikalije potrebnih več informacij o jedkosti za kožo (glej tudi smernico OECD za preskušanje v zvezi z IATA (3)). Če se za preskusno kemikalijo ugotovi, da ni jedka (npr. na podlagi preskusne metode B40, B.40a ali B.65), in je viabilnost tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju manjša ali enaka (≤) 50 %, se za preskusno kemikalijo šteje, da je jedka za kožo v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP.

— Odvisno od regulativnega okvira v državah članicah se lahko za preskusno kemikalijo šteje, da ni jedka za kožo, tj. „brez kategorije“ po GHS ZN/uredbi CLP, če je viabilnost tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju večja kot (>) 50 %.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

37. Za vsako ponovitev je treba podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in podatke o izračunanem deležu viabilnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrščanjem) navesti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih poskusov. To pomeni, da je treba za vsako ponovitev navesti srednje vrednosti ± standardni odklon. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene interakcije med reagentom MTT in obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

Poročilo o preskusu

38. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:

— Snov iz ene sestavine kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

— fizični videz, topnost v vodi in morebitne dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— vir, številka serije, če je na voljo;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;

— pogoji skladiščenja.

Uporabljena model in protokol rekonstruirane človeške pokožnice (ter utemeljitev izbire, če je ustrezno).

▼**M8**

Preskusni pogoji:

— uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice (vključno s številko serije);

— podatki o umerjanju za merilno napravo (npr. spektrofotometer), valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljajo za kvantifikacijo formazana MTT, ter razpon linearnosti merilne naprave; opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;

— opis ustreznosti sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno; popolne informacije v podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:

(i) viabilnost;

(ii) pregradno funkcijo;

(iii) morfologijo;

(iv) obnovljivost in napovedljivost;

(v) kontrole kakovosti modela;

— navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti.

— dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti.

Preskusni postopek:

— podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku (vključno s postopki spiranja, ki se uporabijo po obdobju izpostavljenosti); odmerki uporabljene preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij;

— trajanje in temperatura izpostavljenosti in obdobja inkubacije po izpostavljenosti;

— navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;

— število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola in NSMTT, $NSC_{živo}$ in NSC_{odmrlo}, če je ustrezno);

— opis uporabljenih meril za odločanje/napovednega modela na podlagi uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice;

— opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka (vključno s postopki spiranja).

Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa:

— srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov; sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;

▼M8

— sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

Rezultati:

— preglednice s podatki o posamezni preskusni kemikaliji za vsako ponovitev in vsako ponovljeno meritev, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv in standardnim odklonom;

— če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali barvilne preskusne kemikalije, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, % NSMTT, % $NSC_{živo}$, % NSC_{odmrlo}, standardnim odklonom, končnim pravilnim deležem viabilnosti tkiv;

— rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolami glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;

— opis drugih opaženih učinkov;

— izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), druga revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the „Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards“, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9. april 2009. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(4) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.

(5) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: transkutana električna upornost (TER).

(6) Poglavje B.40bis te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.

(7) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 220). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(10) Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M., in Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C., in Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B., in Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., in Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R., in Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C., in Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109–129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., in Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., in Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E., in Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351–358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27. april 2007. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Opomba: to so prvotni standardi izvajanja za validacijo dveh preskusnih metod. Ti standardi izvajanja se ne smejo več uporabljati, ker je zdaj na voljo posodobljena različica (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. november 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (št. 137), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T., in Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327–334.

(25) Katoh, M., in Hata, K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111–122.

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 159), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 155), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y., in Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33–50.

(29) Welss, T., Basketter, D. A., in Schröder, K. R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231–243.

(30) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393–403.

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (februar 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (revidirano marca 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (februar 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (junij 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24".

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., in McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Rokopis v pripravi.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Na voljo na: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J. D., Lamminstausta, K., in Maibach, H. I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, v: Practical Contact Dermatitis, str. 7–18, (ur. Guin, J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Opomba: to je trenutna različica standardov izvajanja ECVAM, posodobljena leta 2009 zaradi izvajanja GHS ZN. Ti standardi izvajanja se ne smejo več uporabljati, ker je zdaj na voljo posodobljena različica (8), povezana s to smernico za preskušanje.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8. julij 2009.

(41) ES (2001). Direktiva Komisije 2001/59/ES z dne 6. avgusta 2001 o 28. prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi, Uradni list Evropske unije, L 225, str. 1–333.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (9).

Viabilnost celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro), ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo živih celic.

Kemikalija: pomeni snov ali zmes.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne modele, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušenih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (9).

ET_{50}: lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije, glej tudi IC_{50}.

GHS (globalno usklajeni sistem Združenih narodov (ZN) za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

IC_{50}: lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC_{50}), glej tudi ET_{50}.

Prevelik odmerek: količina na pokožnico nanesene preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine pokožnice.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

▼M8

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NSC_{odmrlo}: nespecifična barva v odmrlih tkivih.

$NSC_{živo}$: nespecifična barva v živih tkivih.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT.

Standardi izvajanja (SI): standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

PC: pozitivna kontrola, ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (9).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

Nadomestni preskus: preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot je ustrezno (9).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušenih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

▼**M8**

Draženje kože *in vivo*: je nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Razdraženost kože je lokalna reakcija prizadetega kožnega tkiva, ki se pojavi kmalu po izpostavitvi kože draženju (38). Povzroči jo lokalna vnetna reakcija, v katero je vključen prirojeni (nespecifični) imunski sistem kožnega tkiva. Njena glavna lastnost je povračljiv proces, ki vključuje vnetne reakcije in večino značilnih kliničnih znakov razdraženosti (rdečino, oteklino, srbenje in bolečino), povezanih z vnetnim procesom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

UPLC: tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼**M8**

Dodatek 2

PRESKUSNI MODELI, VKLJUČENI V TO PRESKUSNO METODO

Št.	Ime preskusnega modela	Vrsta validacijske študije	Viri
1	EpiSkin™	Celovita prospektivna validacijska študija (2003–2007). Elementi tega modela so bili uporabljeni za opredelitev bistvenih elementov preskusne metode prvotnih in posodobljenih standardov izvajanja ECVAM (39) (40) (21) (*). Poleg tega so bili podatki o metodi, ki se nanašajo na razlikovanje med nerazvrščenimi in razvrščenimi snovmi, glavna podlaga za opredelitev vrednosti specifičnosti in občutljivosti prvotnih standardov izvajanja (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*prvotni*): preskusni model je bil najprej predmet celovite prospektivne validacije skupaj s št. 1. iz obdobja 2003–2007. Elementi tega modela so bili uporabljeni za opredelitev bistvenih elementov preskusnih metod prvotnih in posodobljenih standardov izvajanja ECVAM (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** prilagoditev prvotnega modela EpiDerm™ je bila validirana z uporabo prvotnih standardov izvajanja ECVAM (21) v letu 2008 (*). (2) (21) (22) (23) (33)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)
3	SkinEthic™ RHE	Validacijska študija na podlagi prvotnih standardov izvajanja ECVAM (21) v letu 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validacijska študija (2011–2012) na podlagi standardov izvajanja iz Smernice OECD za preskušanje 439 (8), ki temeljijo na posodobljenih standardih izvajanja ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) in standardi izvajanja te smernice za preskušanje (8) (*)

(*) Prvotni standardi izvajanja ECVAM (21) so bili pripravljeni leta 2007 po koncu prospektivne validacijske študije (16), s katero se je ocenila učinkovitost preskusnih modelov št. 1 in 2 glede na sistem razvrščanja, opisan v 28. spremembi direktive EU o nevarnih snoveh (41). Leta 2008 sta bila uvedena GHS ZN (1) in uredba CLP, s katerima se je mejna vrednost za razlikovanje med nerazvrščenimi in razvrščenimi snovmi na podlagi rezultata *in vivo* dejansko dvignila z 2,0 na 2,3. Zaradi prilagoditve tej spremenjeni regulativni zahtevi so bili v letu 2009 posodobljeni vrednosti točnosti in seznam referenčnih kemikalij iz standardov izvajanja ECVAM (2) (39) (40). Tako kot prvotni standardi izvajanja so tudi posodobljeni standardi izvajanja večinoma temeljili na podatkih iz modelov št. 1 in 2 (16), vendar so se dodatno uporabili tudi podatki o referenčnih kemikalijah iz modela št. 3. Leta 2010 so bili posodobljeni standardi izvajanja ECVAM uporabljeni za določitev standardov izvajanja, povezanih s temi smernicami za preskušanje (8). Za namen te preskusne metode se model EpiSkin™ šteje za VRM, ker je bil uporabljen za pripravo vseh meril standardov izvajanja. Podrobne informacije o validacijskih študijah, zbirka pridobljenih podatkov in ozadje nujnih prilagoditev standardov izvajanja zaradi izvajanja GHS ZN/uredbe CLP so na voljo v obrazložitvenem referenčnem dokumentu ECVAM/BfR k ustreznim smernicam OECD za preskušanje 439 (23).

SIT: preskus draženja kože.

RHE: rekonstruirana človeška pokožnica.

▼**M8**

Dodatek 3

PARAMETRI PROTOKOLA, SPECIFIČNI ZA VSAKEGA OD PRESKUSNIH MODELOV, VKLJUČENIH V TO PRESKUSNO METODO

Modeli rekonstruirane človeške pokožnice (RhE) dejansko prikazujejo zelo podobne protokole, zlasti vsi uporabljajo 42-urno obdobje po inkubaciji (32) (33) (34) (35). Razlike se nanašajo predvsem na tri parametre v zvezi z različnimi pregradnimi funkcijami preskusnih modelov, in sicer: (A) čas predhodne inkubacije in količina, (B) nanos preskusnih kemikalij in (C) količina po inkubaciji.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
(A) Predhodna inkubacija				
Čas inkubacije	18–24 ur	18–24 ur	< 2 uri	15-30 ur
Količina medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ali 1 ml	0,5 ml
(B) Nanos preskusne kemikalije				
Za tekočine	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Za trdne snovi	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25 µl)
Uporaba najlonske mrežice	se ne uporablja	po potrebi	uporabljena	se ne uporablja
Skupni čas nanosa	15 minut	60 minut	42 minut	15 minut
Temperatura ob nanosu	ST	(a) 25 minut pri ST (b) 35 minut pri 37 °C	ST	ST
(C) Količina po inkubaciji				
Količina medija	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
(D) Največja sprejemljiva razlika				
Standardni odklon med ponovljenimi vzorci tkiv	SO18	SO18	SO18	SO18

ST: sobna temperatura.
DV: destilirana voda.
DPBS: Dulbeccov fosfatni pufer s soljo.

▼**M8**

Dodatek 4

KLJUČNI PARAMETRI IN MERILA ZA SPREJEMLJIVOST ZA USTREZNOST SISTEMA SPEKTROFOTOMETRIJE HPLC/UPLC ZA MERJENJE FORMAZANA MTT, EKSTRAHIRANEGA IZ TKIV REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE (RHE)

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (36) (37)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz živih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz odmrlih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja).	$Površina_{interferenca} \leq 20$ % $površine_{L-LOQ}$ ([1]).
Natančnost	kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	KV ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	% Dev ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	85 % ≤ vpliv matriksa % ≤ 115 %.
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ ([2]).	$Površina_{interferenca} \leq 20$ % $površine_{L-LOQ}$.
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: % Dev ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ. Kontrole kakovosti: % Dev ≤ 15 % in KV ≤ 15 %.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	% Dev ≤ 15 %.
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri določeni temperaturi (npr. 4 °C, –20 °C, –80 °C).	% Dev ≤ 15 %.

([1]) LLOQ: spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

([2]) ULOQ: zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol, tj. 200 µg/ml.

▼M7

B.47 PRESKUSNA METODA ZA DOLOČANJE MOTNJAVE IN PREPUSTNOSTI ROŽENICE GOVEDA ZA OPREDELITEV I) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN II) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 437 (2013). Preskusno metodo za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda (Bovine Corneal Opacity and Permeability – preskusna metoda BCOP) je v letih 2006 in 2010 ocenil Medagencijski koordinacijski odbor za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) v sodelovanju z Evropskim centrom za validacijo alternativnih metod (ECVAM) ter Japonskim centrom za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (1) (2). Pri prvem ocenjevanju je bila preskusna metoda BCOP ocenjena glede na svojo uporabnost za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (1). Pri drugem ocenjevanju je bila navedena preskusna metoda ocenjena glede na svojo uporabnost za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (2). Validacijska zbirka podatkov preskusne metode BCOP je vsebovala skupaj 113 snovi in 100 zmesi (2) (3). Na podlagi obeh ocenjevanj in njunega medsebojnega strokovnega pregleda je bilo ugotovljeno, da se lahko s preskusno metodo pravilno opredelijo kemikalije (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1), ter tiste, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS) (4) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (CLP) ([1]), zato je bila za oba namena podprta kot znanstveno veljavna. Huda poškodba oči je povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Preskusne kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči, so razvrščene v kategorijo 1 po sistemu GHS ZN. Kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, so opredeljene kot kemikalije, ki ne izpolnjujejo meril za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN, kar pomeni da se nanje sklicuje kot na kemikalije brez kategorije po GHS ZN. Ta preskusna metoda vključuje priporočeno uporabo in omejitve preskusne metode BCOP, ki temeljijo na njenih ocenah. Najpomembnejše razlike med prvotno različico smernic za preskušanje OECD iz leta 2009 in posodobljeno različico iz leta 2013 se nanašajo, niso pa omejene na: uporabo preskusne metode BCOP za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistem GHS ZN (odstavka 2 in 7); pojasnila o uporabnosti preskusne metode BCOP za preskušanje alkoholov, ketonov in trdnih snovi (odstavka 6 in 7) ter snovi in zmesi (odstavek 8): pojasnila o tem, kako je treba preskušati površinsko aktivne snovi in zmesi, ki vsebujejo površinsko aktivne snovi (odstavek 28); najnovejše informacije in pojasnila o pozitivnih kontrolah (odstavka 39 in 40); posodobitev meril za odločanje o preskusni metodi BCOP (odstavek 47); posodobitev meril za sprejemljivost študije (odstavek 48); posodobitev elementov poročila o preskusu (odstavek 49); posodobitev Dodatka 1 o opredelitvah pojmov; vključitev Dodatka 2 o napovedovalni zmogljivosti preskusne metode BCOP v okviru različnih sistemov za razvrščanje; posodobitev Dodatka 3 o seznamu kemikalij za preverjanje usposobljenosti ter posodobitev Dodatka 4 o držalu za roženico pri preskusni metodi BCOP (odstavek 1) ter opacitometru (odstavka 2 in 3).

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M7

Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče nadomestiti z enim samim preskusom draženja oči *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon dražilnih učinkov za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjske) strategije preskušanja (5). Pristop od zgoraj navzdol (5) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja, pristop od spodaj navzgor (5) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti. Preskusna metoda BCOP je metoda preskušanja *in vitro*, ki se lahko pod določenimi pogoji in s posebnimi omejitvami uporabi za razvrstitev glede na nevarnosti za oči in označevanje kemikalij. Čeprav se preskusna metoda BCOP ne obravnava kot veljaven samostojen nadomestek za preskus draženja oči *in vivo* na kuncih, se vseeno priporoča kot prvi korak preskusne strategije, kot je pristop od zgoraj navzdol, ki ga priporoča Scott idr. (5), za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, tj. kemikalij, ki jih je treba v kategorijo 1 po GHS ZN razvrstiti brez nadaljnjega preskušanja (4). Ta metoda je priporočljiva tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v sistemu GHS ZN (brez kategorije po GHS ZN) (4), v okviru strategije preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor (5). Vendar če se s preskusno metodo BCOP ne predvidi, da kemikalija povzroča hude poškodbe oči ali razvrstitev glede na draženje oči/hude poškodbe oči, bi bilo treba to kemikalijo dodatno preskusiti (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se določi končna razvrstitev.

V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da v izolirani roženici goveda povzroča motnjavo in povečano prepustnost. Toksični učinki na roženico se merijo z: (i) zmanjšanim prenosom svetlobe (motnjava) in (ii) povečanim prehajanjem barvila natrijevega fluoresceina (prepustnost). Oceni motnjave in prepustnosti roženice po izpostavljenosti preskusni kemikaliji se združita, iz tega rezultata pa se nato izpelje stopnja draženja *in vitro* (IVIS), ki se uporablja za razvrstitev preskusne kemikalije v različne stopnje draženja.

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Ta preskusna metoda temelji na protokolu preskusne metode BCOP odbora ICCVAM (6) (7), ki je bil prvotno razvit na podlagi informacij, pridobljenih iz protokola Inštituta za raziskave *in vitro* (IIVS) in protokola INVITTOX št. 124 (8). Slednji se je uporabil za predvalidacijsko študijo, ki je bila izvedena med letoma 1997–1998 in jo je sponzorirala Evropska skupnost. Oba protokola temeljita na preskusni metodi BCOP, o kateri so prvi poročali Gautheron idr. (9).

Preskusna metoda BCOP se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v sistemu GHS ZN, tj. kemikalij, ki jih je treba razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN (4). Kadar se uporablja za ta namen, je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN, njena splošna točnost 79-odstotna (150/191), delež lažno pozitivnih rezultatov je 25-odstoten (32/126), delež lažno negativnih rezultatov pa 14-odstoten (9/65) (3) (glej preglednico 1 v Dodatku 2). Kadar so iz zbirke podatkov izključene preskusne kemikalije iz določenega kemijskega (npr. alkoholi, ketoni) ali fizikalnega (tj. trdne snovi) razreda, je splošna točnost preskusne metode BCOP glede na sistem za razvrščanje GHS ZN 85-odstotna (111/131), delež lažno pozitivnih rezultatov je 20-odstoten (16/81), delež lažno negativnih rezultatov pa 8-odstoten (4/50) (3). Morebitne pomanjkljivosti preskusne metode BCOP, kadar se uporablja za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), temeljijo na visokem deležu lažno pozitivnih rezultatov za alkohole in ketone ter

▼M7

visokem deležu lažno negativnih rezultatov za trdne snovi, kot kaže validacijska zbirka podatkov (1) (2) (3). Vendar ker s preskusno metodo BCOP niso precenjene vrednosti vseh alkoholov in ketonov, pač pa so nekatere napovedane pravilno, tj. da spadajo v kategorijo 1 po GHS ZN, se ne šteje, da sta ti dve organski funkcionalni skupini izločeni s področij uporabe preskusne metode. Uporabnik te preskusne metode se mora odločiti, ali so morebitne precenjene vrednosti alkohola ali ketona sprejemljive ali je treba izvesti nadaljnje preskušanje po pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Glede lažno negativnih rezultatov za trdne snovi je treba opozoriti, da lahko trdne snovi pri Draizovem preskusu draženja oči *in vivo* povzročijo spremenljive in ekstremne pogoje izpostavljenosti, zaradi česar je napoved njihovega resničnega potenciala draženja lahko brezpredmetna (10). Opozoriti je treba tudi na to, da noben od lažno negativnih rezultatov, opredeljenih v validacijski zbirki podatkov odbora ICCVAM (2) (3) v okviru opredeljevanja kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), ni povzročil stopnje IVIS ≤ 3, kar je merilo, ki se uporablja za opredelitev preskusne kemikalije kot brez kategorije po GHS ZN. Poleg tega lažno negativni rezultati preskusne metode BCOP v tem okviru niso ključni, saj se vse preskusne kemikalije, pri katerih se stopnja IVIS giblje v razponu od 3 do 55, naknadno preskusijo z drugimi ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali – kot zadnja možnost – s preskusom na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve, pri čemer se uporabi strategija zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Ob upoštevanju dejstva, da je mogoče za nekatere trdne kemikalije s preskusno metodo BCOP pravilno napovedati, da spadajo v kategorijo 1 po GHS ZN, se za to fizikalno stanje ne šteje, da je zunaj področja uporabe preskusne metode. Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba stopnjo IVIS > 55 sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči, ki bi jih bilo treba razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN brez nadaljnjega preskušanja. Kot je bilo že navedeno, pa je treba pozitivne rezultate, pridobljene z uporabo alkoholov ali ketonov, razlagati previdno zaradi morebitne precenitve vrednosti.

Preskusna metoda BCOP se lahko uporabi tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje GHS ZN (4). Kadar se uporablja za ta namen, je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN, njena splošna točnost 69-odstotna (135/196), delež lažno pozitivnih rezultatov je 69-odstoten (61/89), delež lažno negativnih rezultatov pa 0-odstoten (0/107) (3) (glej preglednico 2 v Dodatku 2). Delež dobljenih lažno negativnih rezultatov (kemikalije *in vivo*, razvrščene kot brez kategorije po GHS ZN, ki povzročajo stopnjo IVIS > 3, glej odstavek 47) je sorazmerno visok, vendar v tem okviru ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, pri katerih se stopnja IVIS giblje v razponu od 3 do 55, naknadno preskusijo z drugimi ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali – kot zadnja možnost – s preskusom na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve, pri čemer se uporabi strategija zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Pri preskusni metodi BCOP niso vidne nobene posebne pomanjkljivosti za preskušanje alkoholov, ketonov in trdnih snovi, kadar je namenjena opredelitvi kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN) (3). Raziskovalci lahko to preskusno metodo uporabijo za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba negativni rezultat (stopnja IVIS ≤ 3) sprejeti kot kazalnik za to, da razvrstitev ni potrebna (brez kategorije po GHS ZN). Ker se lahko s preskusno metodo BCOP pravilno opredeli le 31 % kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, ta preskusna metoda ne sme biti prva izbira za začetek pristopa od spodaj navzgor (5), če so na voljo druge potrjene in sprejete metode *in vitro* s podobno visoko občutljivostjo, a večjo specifičnostjo.

▼M7

Validacijska zbirka podatkov preskusne metode BCOP je vsebovala skupaj 113 snovi in 100 zmesi (2) (3). Zato se lahko ta metoda uporabi za preskušanje snovi in zmesi.

Preskusna metoda BCOP ni priporočljiva za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot dražilne za oči (kategorija 2 ali kategorija 2A po GHS ZN), ali preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot zmerno dražilne za oči (kategorija 2B po GHS ZN), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN razvrščenih prenizko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN (2) (3). Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrezno metodo.

Pri vseh postopkih na očeh in roženicah goveda je treba upoštevati veljavna pravila in postopke preskusnega laboratorija o ravnanju z živalskim materialom, kamor spadajo med drugim tudi tkiva in tkivne tekočine. Priporočajo se splošni previdnostni ukrepi za laboratorije (11).

Čeprav se pri preskusni metodi BCOP ne proučujejo poškodbe veznice in šarenice, se obravnavajo učinki na roženico, ki so pomembno gonilo pri razvrščanju *in vivo* ob upoštevanju razvrščanja po GHS ZN. Popravljivosti poškodb roženice kot take v preskusni metodi BCOP ni mogoče oceniti. Na podlagi očesnih študij na kuncih je bilo predlagano, da se za opredelitev nekaterih vrst nepopravljivih učnikov lahko uporabi ocena prvotne globine poškodbe roženice (12). Vendar je potrebno nadaljnje znanstveno znanje, da bi razumeli, kako nastanejo nepopravljivi učinki, ki niso povezani z začetno hudo poškodbo. Treba je tudi opozoriti, da s preskusno metodo BCOP ni mogoče oceniti potencialne sistemske toksičnosti, povezane z izpostavljenostjo oči.

Ta preskusna metoda se bo redno posodabljala ob upoštevanju novih informacij in podatkov. Kadar je potrebna popolnejša opredelitev poškodbe roženice, se je lahko uporabna na primer histopatologija. Kot je navedeno v Dokumentu s smernicami OECD št. 160 (13), se uporabnikom priporoča, naj roženice shranijo in pripravijo histopatološke vzorce, ki se lahko uporabijo pri ustvarjanju zbirke podatkov in oblikovanju meril za odločanje, s katerimi se lahko nadalje izboljša točnost te preskusne metode.

Vsak laboratorij, ki to preskusno metodo izvaja prvič, mora uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 3. Laboratorij lahko te kemikalije uporabi kot dokaz svoje tehnične usposobljenosti za izvajanje preskusne metode BCOP, preden pošlje podatke o tej metodi za regulativno razvrstitev glede na nevarnosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskusna metoda BCOP je organotipski model, s katerim se običajna fiziološka in biokemijska funkcija roženice goveda za kratek čas ohrani *in vitro*. Pri tej preskusni metodi se poškodba, ki jo povzroči preskusna kemikalija, oceni tako, da se spremembe motnjave in prepustnosti roženice merijo kvantitativno z opacitometrom oziroma spektrofotometrom vidne svetlobe. Obe meritvi se uporabita za izračun stopnje IVIS, na podlagi katere je kemikalija razporejena v kategorijo razvrstitve glede na nevarnost draženja *in vitro*, da se predvidi zmožnost preskusne kemikalije za draženje oči *in vivo* (glej merila za odločanje, odstavek 48).

Pri preskusni metodi BCOP se uporabljajo izolirane roženice oči sveže zaklanega goveda. Motnjava roženice se meri kvantitativno in ustreza količini svetlobe, ki prodre skozi roženico. Prepustnost se meri kvantitativno in ustreza količini barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi celotno debelino roženice in se

▼M7

zazna v mediju v zadnjem delu držala. Preskusne kemikalije se dodajo v sprednji del držala za roženico in se tako nanesejo na epitelno površino roženice. Dodatek 4 vsebuje opis in sliko držala, ki se uporablja za preskusno metodo BCOP. Držala za roženico na trgu ponujajo različna podjetja, laboratoriji pa jih lahko izdelajo tudi sami.

Izvor in starost oči goveda ter izbor živalskih vrst

Govedo, ki se zakolje v klavnicah, je običajno namenjeno za človeško prehrano ali druge komercialne uporabe. Pri preskusni metodi BCOP se kot vir roženic uporabljajo samo zdrave živali, primerne za vstop v prehransko verigo človeka. Ker so goveda glede na pasmo, starost in spol različno težka, ni priporočene teže v trenutku zakola.

Velikost roženice se lahko pri očeh različno starih živali razlikuje. Roženice z vodoravnim premerom > 30,5 mm in centralno debelino roženice (CCT) ≥ 1 100 μm ima običajno govedo, starejše od osem let, roženice z navpičnim premerom < 28,5 mm in CCT < 900 μm, pa govedo, mlajše od pet let (14). Zato se oči goveda, starejšega od 60 mesecev, običajno ne uporabljajo. Oči goveda, mlajšega od 12 mesecev, se običajno prav tako ne uporabljajo, saj še niso popolnoma razvite, debelina in premer roženice pa sta bistveno manjša kot pri očeh starejšega goveda. Kljub temu se lahko uporabljajo roženice mladih živali (tj. starih od 6 do 12 mesecev), saj ima njihova uporaba nekatere prednosti, kot so večja razpoložljivost, manjši starostni razpon in manjša nevarnost izpostavljenosti goveji spongiformni encefalopatiji za osebje klavnice (15). Ker bi bilo koristno nadaljnje ocenjevanje učinka, ki ga imata velikost in debelina roženice na odzivnost na jedke in zelo dražilne snovi za oči, se uporabnikom priporoča, da poročajo o približni starosti in/ali teži živali, katerih roženice so uporabili v študiji.

Odvzem in prevoz oči v laboratorij

Oči odvzame osebje klavnice. Da bi bilo čim manj mehanskih in drugih vrst poškodb oči, jih je treba odvzeti čim prej po zakolu ter jih takoj po odvzemu in med prevozom hraniti na hladnem. Da oči ne bi bile izpostavljene potencialno dražilnim kemikalijam, osebje klavnice pri spiranju glav živali ne sme uporabljati detergentov.

Oči je treba v dovolj veliki posodi popolnoma potopiti v ohlajeno Hanksovo uravnoteženo raztopino soli (HBSS) in prepeljati v laboratorij tako, da se njihovo stanje čim manj poslabša in/ali da ne pride do bakterijske okužbe. Ker se oči odvzamejo med zakolom, lahko pridejo v stik s krvjo in drugimi biološkimi snovmi, vključno z bakterijami in drugimi mikroorganizmi. Zato je treba zagotoviti, da je tveganje kontaminacije čim manjše (npr. tako da je posoda, v kateri so oči, med odvzemom in prevozom na mokrem ledu ter da se v Hanksovo uravnoteženo raztopino soli, ki se uporablja za shranjevanje oči med prevozom, dodajo antibiotiki [npr. 100 IU/ml penicilina in 100 μg/ml streptomicina]).

Čas med odvzemom oči in uporabo roženic mora biti pri preskusni metodi BCOP čim krajši (običajno se odvzamejo in uporabijo isti dan) in ne sme vplivati na zanesljivost rezultatov preskusa. Ti temeljijo na merilih za izbor oči ter odzivih pozitivnih in negativnih kontrol. Vse oči, uporabljene v preskusu, morajo pripadati isti skupini oči, odvzeti na določeni dan.

Merila za izbor oči, uporabljenih v preskusni metodi BCOP

Po prihodu v laboratorij se skrbno pregleda, ali so oči poškodovane, vključno s povečano motnjavo, praskami in neovaskularizacijo. Uporabljajo se lahko samo roženice nepoškodovanih oči.

▼M7

Kakovost vsake roženice se oceni tudi v poznejši fazi preskusa. Roženice z motnjavo, večjo od sedmih enot ali enakovredne stopnje v primeru uporabe opacitometra in držala za roženice. se po začetnem enournem umerjanju zavržejo (OPOZORILO: opacitometer je treba umeriti v skladu s standardi za določevanje enot motnjave, glej Dodatek 4).

Vsaka tretirana skupina (preskusna kemikalija, sočasne negativne in pozitivne kontrole) je sestavljena iz najmanj treh oči. Pri preskusni metodi BCOP je treba za negativno kontrolo uporabiti tri roženice. Ker se roženice odstranijo s celotnega zrkla in pritrdijo v držala za roženice, se lahko zaradi artefaktov, ki nastanejo zaradi prijemanja, vrednosti motnjave in prepustnosti v posameznih primerih spremenijo (vključno z negativno kontrolo). Poleg tega se vrednosti motnjave in prepustnosti roženic iz roženic za negativno kontrolo uporabljajo za popravljanje vrednosti motnjave in prepustnosti roženic, tretiranih s preskusno kemikalijo, in za pozitivno kontrolo pri izračunih stopenj IVIS.

POSTOPEK

Priprava oči

Nepoškodovane roženice se secirajo tako, da se ohrani 2 do 3 mm širok rob beločnice, kar olajša nadaljnje ravnanje, pri čemer je treba paziti, da se epitelij in endotelij roženice ne poškodujeta. Izolirane roženice se pritrdijo v posebej za to izdelana držala, sestavljena iz sprednjega in zadnjega dela, na katera je roženica pripeta z epitelno oziroma endotelno stranjo. Oba dela držala se do roba napolnita z ogretim Eaglovim minimalnim osnovnim medijem (EMEM) brez fenol rdečega (in sicer najprej zadnji del držala), pri čemer je treba paziti, da ne nastajajo mehurčki. Naprava se nato vsaj eno uro uravnotežuje pri 32 ± 1 °C, kar omogoči, da se roženice uravnotežijo z medijem in da se doseže čim bolj normalna metabolna dejavnost (približna temperatura na površini roženice *in vivo* je 32 °C).

Po uravnoteženju se v oba dela držala doda svež, ogret medij EMEM brez fenol rdečega, za vsako roženico pa se zabeležijo odčitki izhodiščne vrednosti motnjave. Roženice z makroskopskimi poškodbami tkiva (npr. praskami, pigmentacijo, neovaskularizacijo) ali motnjavo, večjo od sedmih enot ali enakovredne stopnje v primeru uporabe opacitometra in držala za roženice, se zavržejo. Vsaj tri roženice se izberejo kot roženice za negativno kontrolo (ali kontrolo s topilom). Preostale roženice se nato razdelijo v tretirano skupino in skupine za pozitivno kontrolo.

Ker ima voda večjo toplotno kapaciteto kot zrak, zagotavlja stabilnejše temperaturne pogoje za inkubacijo. Zato je za ohranjanje držala za roženice in njegove vsebine pri temperaturi 32 ± 1 °C priporočljiva uporaba vodne kopeli. Lahko se uporabljajo tudi inkubatorji za vzdrževanje temperature zraka, če zagotavljajo stabilno temperaturo (tj. s predogrevanjem držal in medijev).

Uporaba preskusne kemikalije

Uporabljata se dva različna protokola tretiranja, in sicer eden za tekočine in površinsko aktivne snovi (trdne snovi ali tekočine), drugi pa za površinsko neaktivne snovi (trdne snovi).

Tekočine se preskušajo nerazredčene. Poltrdne snovi, kreme in voski se običajno preskušajo kot tekočine. Nerazredčene površinsko aktivne snovi se preskusijo pri 10-odstotni masni koncentraciji v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida, destilirani vodi ali drugem topilu, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na preskusni sistem. Če se uporabljajo druge koncentracije raztopin, jih je treba ustrezno utemeljiti. Zmesi, ki vsebujejo površinsko aktivne snovi,

▼M7

se lahko preskušajo nerazredčene ali razredčene v ustrezni koncentraciji, in sicer odvisno od ustreznega scenarija izpostavljenosti *in vivo*. Če se uporabljajo druge koncentracije raztopin, jih je treba ustrezno utemeljiti. Roženice so tekočinam in površinsko aktivnim snovem izpostavljene 10 minut. Če je čas izpostavljenosti drugačen, ga je treba ustrezno znanstveno utemeljiti. Za opredelitev površinsko aktivnih snovi in zmesi, ki vsebujejo površinsko aktivne snovi, glej Dodatek 1.

Površinsko neaktivne trdne snovi se običajno preskušajo kot raztopine ali suspenzije pri 20-odstotni masni koncentraciji v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida, destilirani vodi ali drugem topilu, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na preskusni sistem. V določenih okoliščinah in ob ustrezni znanstveni utemeljitvi se lahko trdne snovi preskušajo tudi nerazredčene, tako da se neposredno nanesejo na površino roženice, pri čemer se uporablja odprta metoda (glej odstavek 32). Roženice so trdnim snovem izpostavljene štiri ure, čas izpostavljenosti pa se lahko tako kot pri tekočinah in površinsko aktivnih snoveh spremeni na podlagi ustrezne znanstvene utemeljitve.

Uporabljajo se lahko različne metode tretiranja, in sicer glede na fizikalne in kemijske lastnosti preskusne kemikalije (npr. trdne snovi, tekočine, viskozne ali neviskozne tekočine). Najpomembneje je, da preskusna kemikalija dovolj dobro pokriva epitelno površino in da se med spiranjem ustrezno odstrani. Zaprta metoda se običajno uporablja za neviskozne do nekoliko viskozne tekoče preskusne kemikalije, medtem ko se odprta metoda običajno uporablja za polviskozne in viskozne tekoče preskusne kemikalije in nerazredčene trdne snovi.

Pri zaprti metodi se prek dozirnih odprtin v zgornji površini v sprednji del držala doda toliko preskusne kemikalije (750 µl), da ta prekrije epitelno stran roženice, odprtine pa se nato med obdobjem izpostavljenosti zatesnijo s tesnilnimi čepki. Vsaka roženica mora biti preskusni kemikaliji izpostavljena dovolj dolgo.

Pri odprti metodi se pred tretiranjem s sprednjega dela držala odstranita obroček za zapiranje okenca in stekleno okence. Kontrolna ali preskusna kemikalija (750 µl ali dovolj preskusne kemikalije, da je prekrita celotna roženica) se nanese neposredno na epitelno površino roženice z mikropipeto. Če se preskusna kemikalija težko pipetira, se jo lahko zaradi lažjega doziranja nanese s pipeto za neposredno izpodrivanje tlaka. Konica pipete za neposredno izpodrivanje tlaka se vstavi v dozirno konico brizge, da se material napolni v konico za izpodrivanje pod tlakom. Ob tem ko se potisni bat počasi sprošča, se vlečni bat pipete pomakne navzgor. Če v konici pipete začnejo nastajati zračni mehurčki, se preskusna kemikalija odstrani (zavrže) in postopek ponovi, dokler konica ni polna in v njej ni zračnih mehurčkov. Po potrebi se lahko uporabi običajna brizga (brez igle), saj omogoča merjenje natančne količine preskusne kemikalije in lažji nanos na epitelno površino roženice. Po odmerjanju se na sprednji del držala ponovno namesti stekleno okence in tako ponovno ustvari zaprt sistem.

Inkubacija po izpostavljenosti

Po obdobju izpostavljenosti se preskusna kemikalija, kemikalija za negativno kontrolo ali kemikalija za pozitivno kontrolo odstrani iz sprednjega dela držala, epitelij pa se najmanj trikrat (oziroma dokler preskusna snov ni več vidna) spere z EMEM (ki vsebuje fenol rdeče). Za spiranje se uporablja medij, ki vsebuje fenol rdeče, saj se lahko s spreminjanjem barv v fenol rdečem nadzoruje, ali je bilo spiranje kislih ali alkalnih preskusnih kemikalij učinkovito. Če je fenol rdeče še vedno razbarvano (rumeno ali vijoličasto) ali če je preskusna kemikalija še vedno vidna, se roženice sperejo več kot trikrat. Ko v mediju ni več preskusne

▼M7

kemikalije, se roženice še zadnjič sperejo z EMEM (brez fenol rdečega). Pri zadnjem spiranju se uporabi EMEM (brez fenol rdečega), s čimer se zagotovi, da je bilo fenol rdeče odstranjeno iz sprednjega dela držala pred merjenjem motnjave. Nato se sprednji del držala ponovno napolni s svežim EMEM brez fenol rdečega.

Pri tekočinah ali površinsko aktivnih snoveh se roženice po spiranju dajo v inkubator še za dve dodatni uri pri 32 ± 1 °C. V določenih okoliščinah je po obdobju izpostavljenosti koristna tudi daljša inkubacija, vendar je to odvisno od vsakega primera posebej. Roženice, ki se preskušajo s trdnimi snovmi, se po štirih urah izpostavljenosti temeljito sperejo, vendar pri njih nadaljnja inkubacija ni potrebna.

Po koncu inkubacije, ki sledi obdobju izpostavljenosti, za tekočine in površinsko aktivne snovi in po koncu štiriurne izpostavljenosti za površinsko neaktivne trdne snovi se zabeležita motnjava in prepustnost vsake roženice. Poleg tega se vsaka roženica vizualno pregleda in se zabeležijo vsa pomembnejša opažanja (npr. lupljenje tkiva, prisotnost ostanka preskusne kemikalije, neenotni vzorci motnjave). Ta opažanja so lahko pomembna, saj se lahko izražajo z odkloni pri odčitkih opacitometra.

Kontrolne kemikalije

V vsak poskus sta vključeni sočasna negativna kontrola ali kontrola s topilom/vehiklom ter pozitivna kontrola.

Pri preskušanju 100-odstotne tekoče snovi se v preskusno metodo BCOP vključi sočasna negativna kontrola (npr. 0,9-odstotna raztopina natrijevega klorida ali destilirana voda), da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in zagotovijo izhodiščne vrednosti za končne točke preskusa. Ta kontrola tudi zagotavlja, da preskusni pogoji ne povzročajo dražilnih reakcij.

Pri preskušanju razredčene tekočine, površinsko aktivne ali trdne snovi se v preskusno metodo BCOP vključi primerjalna kontrolna skupina s topilom/vehiklom, da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in zagotovijo izhodiščne vrednosti za končne točke preskusa. Uporablja se lahko samo tako topilo/vehikel, za katerega je dokazano, da nima škodljivih učinkov na preskusni sistem.

Kemikalija, za katero je znano, da povzroča pozitiven odziv, se v vsak poskus vključi kot sočasna pozitivna kontrola, da se preveri celovitost preskusnega sistema in njegova pravilna izvedba. Da se lahko oceni variabilnost odziva pozitivne kontrole v daljšem časovnem obdobju pa stopnja dražilnega odziva ne sme biti prevelika.

Primer pozitivne kontrole za tekoče preskusne kemikalije je 100-odstotni etanol ali 100-odstotni dimetilformamid. Primer pozitivne kontrole za trdne preskusne kemikalije je 20-odstotna masna koncentracija imidazola v 0,9-odstotni raztopini natrijevega klorida.

Primerjalne kemikalije so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

Merjene končne točke

Motnjava je odvisna od količine svetlobe, ki prodre skozi roženico. Motnjava roženice se meri kvantitativno s pomočjo opacitometra, pri čemer se meri neprekinjeno.

Prepustnost je odvisna od količine barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi vse celične sloje roženice (tj. od epitelija na zunanji površini roženice do endotelija na notranji površini roženice). V sprednji del držala za roženico, na katerega je pripeta epitelna stran roženice, se doda 1 ml raztopine natrijevega fluoresceina (4 ali 5 mg/ml pri testiranju tekočin in površinsko aktivnih snovi oziroma površinsko neaktivnih snovi), medtem ko se zadnji del držala, na katerega je pripeta endotelna stran roženice, napolni s svežim EMEM. Držalo se nato

▼M7

da v inkubator v vodoravnem položaju za 90 ± 5 minut pri 32 ± 1 °C. Količina natrijevega fluoresceina, ki prodre v zadnji del držala, se meri kvantitativno s pomočjo spektrofotometrije UV/VIS. Spektrofotometrične meritve pri 490 nm se beležijo kot neprekinjeno merjene vrednosti optične gostote (OD490) ali absorbance. Prepuščanje fluoresceina se določa z vrednostmi OD490, ki so bile izmerjene s spektrofotometrom vidne svetlobe pri standardni dolžini poti 1 cm.

Namesto spektrofotometra se lahko uporabi tudi bralnik 96-jamičnih mikrotitrskih plošč, pod pogojem, da: (i) se lahko določi linearno merilno območje bralnika za določevanje vrednosti fluoresceina OD490 in (ii) se v 96-jamični mikrotitrski plošči uporablja pravilna količina vzorcev fluoresceina, zaradi česar vrednosti OD490 ustrezajo standardni dolžini poti 1 cm (za to so lahko potrebne popolnoma napolnjene posode [navadno 360 μl]).

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Potem ko se popravita vrednost motnjave in srednja vrednost prepustnosti (OD490) za vrednosti ozadja za motnjavo in vrednosti prepustnosti negativne kontrole OD490, se srednji vrednosti motnjave in prepustnosti OD490 za vsako tretirano skupino združita v empirično izpeljani formuli, s katero se izračuna stopnja IVIS za vsako tretirano skupino, kot sledi:

stopnja IVIS = srednja vrednost motnjave + (15 × srednja vrednost prepustnosti OD490).

Sina idr. (16) so poročali, da je bila ta formula izpeljana na podlagi študij v enem in več laboratorijih. Podatki za 36 spojin, pridobljeni med študijo, izvedeno v več laboratorijih, so bili ocenjeni z multivariantno analizo, s katero se je določila najustreznejša enačba za podatke *in vivo* ter *in vitro*. To analizo so izvedli znanstveniki dveh različnih podjetij, ki so izpeljali skoraj identični enačbi.

Vrednosti motnjave in prepustnosti je treba oceniti tudi neodvisno, da se ugotovi, ali preskusna kemikalija skozi eno od dveh končnih točk učinkuje jedko ali zelo dražilno (glej merila za odločanje).

Merila za odločanje

Mejne vrednosti stopnje draženja *in vitro* (IVIS) za opredelitev preskusnih kemikalij kot takih, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), in takih, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN), so:

IVIS	GHS ZN
≤ 3	brez kategorije
> 3 ≤ 55	napoved ni mogoča
> 55	kategorija 1

Merila za sprejemljivost študije

Preskus se šteje za sprejemljivega, če je pri pozitivni kontroli stopnja IVIS znotraj dveh standardnih odklonov veljavne srednje vrednosti iz preteklih preskusov, ki jo je treba posodobiti vsaj vsake tri mesece ali vedno, kadar preskus izvajajo laboratoriji, ki preskuse izvajajo redko (tj. manj kot enkrat mesečno). Iz odzivov negativnih kontrol s topilom/vehiklom morajo biti razvidne vrednosti motnjave in prepustnosti, ki so manjše od veljavnih zgornjih omejitev vrednosti ozadja za motnjavo in prepustnost roženic goveda, obdelanih z zadevnimi negativnimi kontrolami ali kontrolami s topilom/vehiklom. Kadar je razvrstitev

▼M7

nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz vsaj treh roženic. Vendar je treba v primeru mejnih rezultatov pri prvi ponovitvi preskušanja razmisliti o drugi ponovitvi (ki pa ni nujno potrebna), pa tudi tretji, če srednje vrednosti stopnje IVIS iz prvih dveh ponovitvah niso skladne. V tem okviru se rezultat prve ponovitve preskušanja šteje za mejnega, če napovedi pri treh roženicah niso bile skladne, tako da:

— napovedi pri dveh od treh roženic niso bile skladne s srednjo vrednostjo vseh treh roženic ALI

— napovedi pri eni od treh roženic niso bile skladne s srednjo vrednostjo vseh treh roženic IN je neskladni rezultat odstopal za > 10 enot stopnje IVIS od mejne vrednosti IVIS, ki je 55.

— Če se pri ponovitvi preskušanja potrdi napoved iz prve ponovitve preskušanja (ki temelji na srednji vrednosti stopnje IVIS), se lahko končna odločitev sprejme brez nadaljnjega preskušanja. Če se pri ponovitvi preskušanj pojavi neskladna napoved iz prve ponovitve preskušanja (ki temelji na srednji vrednosti stopnje IVIS), je treba izvesti tretjo in končno ponovitev preskušanja za razjasnitev neenakih napovedi in razvrstitev preskusne kemikalije. Nadaljnje preskušanje za razvrščanje in označevanje se lahko odpravi, če je pri kateri koli ponovitvi preskusa napovedana kategorija 1 po GHS ZN.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki, če so pomembni za izvedbo študije:

Preskusne in kontrolne kemikalije:

— kemijska imena, na primer strukturno ime, ki ga uporablja Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana; registrska številka CAS (RN), če je znana;

— čistost in sestava preskusne/kontrolne kemikalije (v masnih odstotkih), če so ti podatki na voljo;

— fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, kot so agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, stabilnost, kemijski razred, topnost v vodi;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost, če je znana.

Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju:

— ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije.

Pogoji preskusne metode:

— uporabljeni opacitometer (npr. model in specifikacije) ter nastavitve instrumenta;

— podatki o umerjanju za merilno napravo, s katero sta se merili motnjava in prepustnost (npr. opacitometer in spektrofotometer), da se zagotovi linearnost meritev;

— vrsta uporabljenih držal za roženico (npr. model in specifikacije);

▼M7

— opis ostale uporabljene opreme;

— postopek, ki se je uporabil za zagotavljanje celovitosti (tj. točnosti in zanesljivosti) preskusne metode v daljšem časovnem obdobju (npr. redno preskušanje kemikalij za preverjanje usposobljenosti).

Merila za sprejemljivost preskusa:

— sprejemljiva sočasna pozitivna in negativna kontrola na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;

— po potrebi razpon sprejemljivih referenčnih sočasnih kontrol na podlagi podatkov iz preteklih preskusov.

Zbiranje in priprava oči:

— podatki o viru oči (tj. obrat, v katerem so bile odvzete);

— premer roženice kot merilo za starost živalskega vira in primernost za test;

— pogoji hranjenja in prevoza oči (npr. datum in čas odvzema oči, čas do začetka preskušanja, transportni medij in temperaturni pogoji, morebitni uporabljeni antibiotiki);

— priprava in namestitev roženic govedi, vključno z izjavami glede njihove kakovosti, temperature držal za roženice in merili za izbiro roženic, uporabljenih za preskušanje.

Preskusni postopek:

— uporabljeno število ponovitev;

— opredelitev uporabljenih negativnih in pozitivnih kontrol (če je ustrezno, tudi kontrole s topilom in primerjalne kontrole);

— uporabljene koncentracije preskusne kemikalije, nanos, čas izpostavljenosti in čas po inkubaciji, ki sledi obdobju izpostavljenosti;

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka;

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje.

Rezultati

— preglednice s podatki iz posameznih preskusnih vzorcev (npr. vrednosti motnjave in OD490 ter izračunane stopnje IVIS za preskusno kemikalijo ter pozitivne, negativne in primerjalne kontrole [če so bile vključene], prikazane v obliki preglednice, vključno s podatki iz ponovitev preskusov s ponovljenimi vzorci, če so bili izvedeni, ter srednje vrednosti ± standardni odklon za vsak poskus);

— opis drugih opaženih učinkov;

— izpeljana razvrstitev po GHS ZN *in vitro*, če je ustrezna.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

▼**M7**

VIRI

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 07-4517. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH št. publikacije: 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, št. 189, OECD, Pariz.

(4) ZN (2011). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), ST/SG/AC.10/30. Rev. 4, New York in Ženeva: Združeni narodi. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P.in Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1–9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. V: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 07-4517. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. V: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 10-7553A. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italija: Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. in Sina, J. F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 442–449.

(10) Prinsen, M. K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20: 78–81.

(11) Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. in Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Na voljo na: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J. K., Parker, R. D. in Jester, J. V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36: 106–117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, št. 160. Sprejet 25. oktobra 2011. Pariz: Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj.

(14) Doughty, M. J., Petrou, S. in Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73: 2159–2165.

(15) Collee, J. in Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636–641.

(16) Sina, J. F., Galer, D. M., Sussman, R. S., Gautheron, P. D., Sargent, E. V., Leong, B., Shah, P. V., Curren, R. D. in Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26: 20–31.

(17) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH št. publikacije: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Na voljo na: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Št. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (rev. 1997).

Na voljo na: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode.

Primerjalna kemikalija: kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir, (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušanega razreda, (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti, (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu želenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

Motnjava roženice: merjenje stopnje motnjave roženice po izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Povečana motnjava roženice pomeni, da je roženica poškodovana. Motnjava se lahko ocenjuje subjektivno, na primer z Draizovim testom draženja oči na kuncih, ali objektivno z inštrumentom, kot je „opacitometer“.

Prepustnost roženice: kvantitativno merjenje poškodb epitelija roženice z določitvijo količine barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi vse celične plasti roženice.

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in „kategorijo 2 po GHS ZN“ (4).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki ob izpostavljenosti temu sredstvu lahko povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Stopnja draženja *in vitro* (IVIS): empirično izpeljana formula, ki se uporablja pri preskusni metodi BCOP, pri kateri se srednje vrednosti motnjave in prepustnosti za vsako tretirano skupino združijo v eno samo vrednost *in vitro* za vsako tretirano skupino. Stopnja IVIS = srednja vrednost motnjave + (15 x srednja vrednost prepustnosti).

Nepopravljivi učinki na oči: glej „Huda poškodba oči“.

▼M7

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (4).

Negativna kontrola: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2, 2A ali 2B po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za „brez kategorije po GHS ZN“.

Opacitometer: instrument za merjenje motnjave roženice, ki kvantitativno ocenjuje prenos svetlobe skozi roženico. Običajno je sestavljen iz dveh delov, ki imata vsak svoj vir svetlobe in fotocelico. En del se uporablja za tretirano roženico, drugi pa za umerjanje in nastavitev instrumenta na vrednost nič. Svetloba halogene svetilke se skozi kontrolni del (prazna komora brez okenc ali tekočine) usmeri v fotocelico in primerja s svetlobo, usmerjeno v fotocelico skozi preskusni del, v katerem je komora z roženico. Nato se primerja razlika v svetlobi, prenesene iz fotocelic, in se na digitalnem zaslonu prikaže numerična vrednost motnjave.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Popravljivi učinki na oči: glej „Draženje oči“.

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti.

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in „kategorijo 1 po GHS ZN“ (4).

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (4).

▼M7

Površinsko aktivna snov: je snov, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo.

Zmes, ki vsebuje površinsko aktivno snov: v okviru te preskusne metode je to zmes, ki vsebuje eno ali več površinsko aktivnih snovi, pri čemer je njihova končna koncentracija > 5 %

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (4).

Kategorija 1 po GHS ZN: glej „Huda poškodba oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN: glej „Draženje oči“.

Brez kategorije po GHS ZN: kemikalije, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN. Ta pojem je sopomenka za „brez razvrstitve“.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen.

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti preskusne kemikalije.

▼M7

Dodatek 2

NAPOVEDOVALNA ZMOGLJIVOST PRESKUSNE METODE BCOP

Preglednica 1

Napovedovalna zmogljivost preskusne metode BCOP za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči [kemikalije kategorije 1, proti kemikalijam, ki ne spadajo v kategorijo 1 (kat. 2 + brez kat.) po GHS ZN/uredbi CLP EU; kemikalije kategorije I proti kemikalijam, ki ne spadajo v kategorijo I (kat. II + kat. III + kat. IV) po US EPA]

Sistem za razvrščanje	Št.	Točnost		Občutljivost		Lažno negativni rezultati		Specifičnost		Lažno pozitivni rezultati	
		v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.
GHS ZN uredba CLP EU	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Preglednica 2

Napovedovalna zmogljivost preskusne metode BCOP za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči („nedražilne snovi za oči“) [kemikalije brez kategorije proti kemikalijam, ki so razvrščene v kategorije (kat. 1 + kat. 2) po GHS ZN/uredbi CLP EU; kemikalije kategorije IV proti kemikalijam, ki ne spadajo v kategorijo IV (kat. I + kat. II + kat. III) po US EPA]

Sistem za razvrščanje	Št.	Točnost		Občutljivost		Lažno negativni rezultati		Specifičnost		Lažno pozitivni rezultati	
		v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.	v %	št.
GHS ZN uredba CLP EU	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Dodatek 3

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI ZA PRESKUSNO METODO BCOP

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno opredelijo razvrstitev glede na nevarnosti za oči za 13 kemikalij, priporočenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih za oči, temeljijo pa na rezultatih preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (TG 405) (17) in sistemu za razvrščanje GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (4). Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro* iz preskusne metode BCOP. Referenčni podatki so na voljo v dokumentu s povzetki) (3) ter dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusne metode BCOP (2) (18).

Preglednica 1

Priporočene kemikalije za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskusno metodo BCOP

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	Razvrstitev *in vivo* ([2])	Razvrstitev po BCOP
benzalkonijev klorid (5-odstotni)	8001-54-5	onijska spojina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
klorheksidin	55-56-1	amin, amidin	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
dibenzoil-L-vinska kislina	2743-38-6	karboksilna kislina, ester	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
imidazol	288-32-4	heterociklična spojina	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
triklorocetna kislina (30-odstotna)	76-03-9	karboksilna kislina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	kislinski halid	tekočina	kategorija 2A	točna/zanesljiva napoved ni mogoča
etil-2-metilacetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekočina	kategorija 2B	točna/zanesljiva napoved ni mogoča
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna snov	kategorija 2 ([3])	točna/zanesljiva napoved ni mogoča
dinatrijeva sol EDTA	25102-12-9	amin, karboksilna kislina (sol)	trdna snov	brez razvrstitve	brez razvrstitve
tween 20	9005-64-5	ester, polieter	tekočina	brez razvrstitve	brez razvrstitve
2-merkaptopirimidin	1450-85-7	kislinski halid	trdna snov	brez razvrstitve	brez razvrstitve
fenilbutazon	50-33-9	heterociklična spojina	trdna snov	brez razvrstitve	brez razvrstitve

▼**M7**

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	Razvrstitev *in vivo* ([2])	Razvrstitev po BCOP
polioksietilen 23 lauril eter (BRIJ-35) (10-odstotni)	9002-92-0	alkohol	tekočina	brez razvrstitve	brez razvrstitve

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS)

([1]) Vsaki preskusni kemikaliji so bili dodeljeni kemijski razredi, pri čemer se je uporabil standardni sistem za razvrščanje, ki temelji na sistemu za razvrščanje MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (na voljo na: http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na podlagi rezultatov preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (OECD TG 405) (17) in z uporabo GHS ZN (4).

([3]) Razvrščanje v kategorijo 2A ali 2B je odvisno od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene 3 živali. Vse končne točke, razen rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je rdečina veznice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deseti dan.

▼M7

Dodatek 4

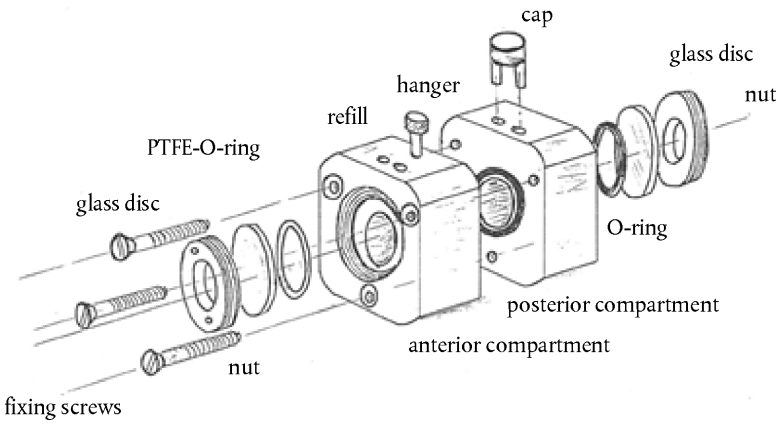
DRŽALO ZA ROŽENICO ZA DOLOČANJE MOTNJAVE IN PREPUSTNOSTI ROŽENICE GOVEDA (BCOP)

Držala za roženico za BCOP so narejena iz inertnega materiala (npr. polipropilena). Sestavljena so iz dveh polovic (sprednje in zadnje komore) ter dveh podobnih cilindričnih notranjih posodic. Vsaka komora je zasnovana tako, da je njena prostornina približno 5 ml in se konča s steklenim okencem, skozi katerega se beležijo meritve prepustnosti. Premer posamezne notranje komore je 1,7 cm, globina pa 2,2 cm ([1]). Tesnilni obroček na zadnji komori preprečuje iztekanje. Roženice se z endotelno stranjo navzdol položijo na tesnilni obroček zadnje komore, sprednja komora pa se položi na epitelno stran roženice. Obe komori sta pritrjeni skupaj s tremi vijaki iz nerjavnega jekla, ki so nameščeni na zunanjih robovih komore. Na koncu vsake komore je stekleno okence, ki ga je mogoče za lažji dostop do roženice odstraniti. Med steklenim okencem in komoro je tesnilni obroček, ki preprečuje iztekanje. Skozi luknjici na vrhu vsake komore se vnašajo in odstranjujejo medij in preskusne kemikalije. Med tretiranjem in inkubacijo sta zaprti z gumijastimi čepki. Prenos svetlobe skozi držala za roženice se lahko spremeni, saj lahko učinki fizične obrabe ali kopičenja ostankov preskusnih kemikalij v luknjah notranje komore ali na steklenih okencih vplivajo na razpršitev svetlobe ali odbojnost. Posledice tega so lahko povečanje ali zmanjšanje izhodiščne vrednosti prenosa svetlobe (in, nasprotno, odčitkov izhodiščne vrednosti motnjave) skozi držala za roženice, kar se lahko opazi kot znatne spremembe pri pričakovanih meritvah izhodiščne začetne vrednosti motnjave roženice v posameznih komorah (to pomeni, da se lahko začetne vrednosti motnjave roženice v posebnih posameznih držalih za roženice od pričakovanih izhodiščnih vrednosti redno razlikujejo za več kot dve ali tri enote motnjave). Vsak laboratorij mora razmisliti o vzpostavitvi programa za ocenjevanje sprememb pri prenosu svetlobe skozi držala za roženice, in sicer glede na naravo preskušenih kemijskih lastnosti in pogostost uporabe komor. Za določitev izhodiščnih vrednosti se lahko držala za roženice pregledajo pred redno uporabo, tako da se izmerijo izhodiščne vrednosti motnjave (ali prenosa svetlobe) komor, popolnoma napolnjenih z medijem brez roženic. Držala za roženice se med obdobji uporabe nato redno pregledujejo, da se ugotovi, ali je pri prenosu svetlobe prišlo do sprememb. Vsak laboratorij lahko določi pogostost pregledovanja držal za roženice, in sicer glede na preskušene kemikalije, pogostost uporabe in opažene spremembe v izhodiščnih vrednostih motnjave roženice. Če se opazijo znatne spremembe pri prenosu svetlobe skozi držala za roženice, je treba razmisliti o ustreznih postopkih čiščenja in/ali poliranja notranje površine držal za roženice ali njihovi zamenjavi.

([1]) Navedene dimenzije se nanašajo na držala za roženico, ki se uporabljajo za krave, stare od 12 do 60 mesecev. Če se uporabljajo živali, stare od 6 do 12 mesecev, je treba držalo zasnovati tako, da je prostornina vsake komore 4 ml, premer obeh notranjih posodic 1,5 cm in njuna globina 2,2 cm. Pri vsakem novo zasnovanem držalu za roženico je pomembno, da je razmerje med izpostavljeno površino roženice in prostornino zadnje komore enako razmerju pri običajnih držalih za roženico. Tako se zagotovi, da se pravilno določijo vrednosti prepustnosti za izračun stopnje IVIS s predlagano formulo.

▼M7

Držalo za roženico: tridimenzionalna risba držala z grafično ločenimi deli



▼M7

Dodatek 5

OPACITOMETER

Opacitometer je naprava, ki meri prenos svetlobe. Na primer pri opremi OP-KIT podjetja Electro Design (Riom, Francija), uporabljeni pri preskusni metodi BCOP, se svetloba halogene svetilke skozi kontrolni del (prazna komora brez okenc ali tekočine) usmeri v fotocelico in primerja s svetlobo, usmerjeno v fotocelico skozi preskusni del, v katerem je komora z roženico. Nato se primerja razlika v svetlobi, prenesene iz fotocelic, in se na digitalnem zaslonu prikaže numerična vrednost motnjave. Enote motnjave so že določene. Uporabijo se lahko druge vrste opacitometrov z drugačno zasnovo (npr. take, pri katerih vzporedne meritve v kontrolnem in poskusnem delu niso potrebne), če je dokazano, da lahko dajo podobne rezultate kot validirana oprema.

Opacitometer mora znotraj razpona odčitkov vrednosti motnjave zagotoviti linearni odziv, v katerem so upoštevane mejne vrednosti, ki se uporabljajo v različnih sistemih za razvrščanje, opisanih v modelu za napovedovanje (tj. do mejne vrednosti, ki določa jedkost/močno draženje). Da so izmerjene vrednosti do 75–80 enot motnjave linearne in natančne, je treba opacitometer umeriti s kalibratorji. Kalibratorji se vstavijo v komoro za umerjanje (komora za roženico, ki je zasnovana tako, da se vanjo lahko namestijo kalibratorji) in odčitavajo na opacitometru. Komora za umerjanje je zasnovana tako, da so kalibratorji na približno enaki oddaljenosti med svetlobo in fotocelico kot roženice med merjenjem prepustnosti. Referenčne in začetne nastavljene vrednosti so odvisne od vrste uporabljene opreme. Linearnost meritev prepustnosti je treba zagotoviti z ustreznimi postopki (za posamezne instrumente). Na primer za opremo OP-KIT podjetja Electro Design (Riom, Francija) je opacitometer najprej umerjen na enoto prepustnosti 0, pri čemer se uporabi komora za umerjanje brez kalibratorja. Nato se v komoro za umerjanje eden za drugim namestijo trije različni kalibratorji in izmeri prepustnost. Kalibratorji 1, 2 in 3 morajo zagotoviti odčitke prepustnosti, ki ustrezajo vnaprej določenim vrednostim 75, 150 oziroma 225 enot motnjave ± 5 %.

▼M7

B.48 PRESKUSNA METODA NA IZOLIRANIH OČEH PIŠČANCEV ZA OPREDELITEV I) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN II) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 438 (2013). Preskusno metodo na izoliranih očeh piščancev (Isolated Chicken Eye – preskusna metoda ICE) je v letih 2006 in 2010 ocenil Medagencijski koordinacijski odbor za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) v sodelovanju z Evropskim centrom za validacijo alternativnih metod (ECVAM) ter Japonskim centrom za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (1) (2) (3). Pri prvem ocenjevanju je bila preskusna metoda ICE potrjena kot znanstveno veljavna preskusna metoda, ki se uporablja kot presejalni test za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1), kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) (2) (4) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (CLP) ([1]). Pri drugem ocenjevanju je bila preskusna metoda ICE ocenjena glede na svojo uporabnost kot presejalni test za opredelitev kemikalij, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v GHS ZN (3) (4). Rezultati validacijske študije in priporočila odbora za medsebojni strokovni pregled so podprli prvotno priporočilo za uporabo preskusne metode ICE za razvrščanje kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), saj se razpoložljiva zbirka podatkov od prvotne validacije odbora ICCVAM ni spremenila. Na tej stopnji nadaljnja priporočila za razširitev področja uporabe preskusne metode ICE, da bi se vanjo vključile tudi druge kategorije, niso bila predlagana. Ponovno se je ocenila zbirka podatkov *in vitro* ter *in vivo*, uporabljenih v validacijski študiji, pri čemer se je osredotočilo na oceno uporabnosti preskusne metode ICE za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (5). Pri tej ponovni oceni je bilo ugotovljeno, da se preskusna metoda ICE lahko uporabi tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v GHS ZN (4) (5). Ta preskusna metoda vključuje priporočeno uporabo in omejitve preskusne metode ICE, ki temeljijo na teh ocenah. Najpomembnejše razlike med prvotno različico smernic za preskušanje OECD iz leta 2009 in posodobljeno različico iz leta 2013 se nanašajo, niso pa omejene na: uporabo preskusne metode ICE za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistem za razvrščanje GHS ZN, posodobitev elementov poročila o preskusu, posodobitev Dodatka 1 o opredelitvah pojmov ter posodobitev Dodatka 2 o seznamu kemikalij za preverjanje usposobljenosti.

Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče nadomestiti z enim samim preskusom draženja oči *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon dražilnih učinkov za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjske) strategije preskušanja (6). Pristop od zgoraj navzdol (7) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja, pristop od spodaj navzgor (7) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M7

bi jo bilo treba razvrstiti. Preskusna metoda ICE je metoda preskušanja *in vitro*, ki se lahko pod določenimi pogoji in s posebnimi omejitvami, kot so opisane v odstavkih od 8 do 10, uporabi za razvrstitev glede na nevarnosti za oči in označevanje kemikalij. Čeprav se preskusna metoda ICE ne obravnava kot veljaven samostojen nadomestek preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, se vseeno priporoča kot prvi korak preskusne strategije, kot je pristop od zgoraj navzdol, ki ga priporoča Scott idr. (7), za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, tj. kemikalij, ki jih je treba v kategorijo 1 po GHS ZN razvrstiti brez nadaljnjega preskušanja (4). Ta metoda je priporočljiva tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, kot je opredeljeno v sistemu GHS ZN (brez kategorije) (4), zaradi česar se lahko uporabi kot prvi korak v okviru strategije preskušanja od spodaj navzgor (7). Vendar če se s preskusno metodo ICE ne predvidi, da kemikalija povzroča hude poškodbe oči ali razvrstitev glede na draženje oči/hude poškodbe oči, bi bilo treba to kemikalijo dodatno preskusiti (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se določi končna razvrstitev. Poleg tega se je treba pred uporabo pristopa od spodaj navzgor pri preskusni metodi ICE v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso GHS ZN, posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi.

V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno (ne)zmožnost, da v izoliranem očesu piščanca povzroči toksičnost. Toksični učinki na roženico se merijo s: (i) kvalitativnim ocenjevanjem motnjave, (ii) kvalitativnim ocenjevanjem poškodbe epitelija na podlagi nanosa fluoresceina na oko (zadrževanje fluoresceina), (iii) kvantitativnim merjenjem povečane debeline (nabreklosti) in (iv) kvalitativnim ocenjevanjem makroskopske morfološke poškodbe na površini. Motnjava roženice, nabreklost in ocenjevanje poškodb po izpostavljenosti preskusni kemikaliji se najprej ocenijo posamično, nato pa združijo, da se lahko določi razvrstitev glede na draženje oči.

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Ta preskusna metoda temelji na protokolu, predlaganem v Dokumentu s smernicami OECD št. 160 (8), ki je bil razvit na podlagi mednarodne validacijske študije (1) (3) (9) odbora ICCVAM, pri kateri so sodelovali Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), Japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) ter Oddelek za toksikologijo in uporabno farmakologijo nizozemskega Inštituta za raziskave TNO (Nizozemska). Protokol temelji na informacijah iz objavljenih protokolov ter protokolu, ki ga trenutno uporablja TNO (10) (11) (12) (13) (14).

V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preizkušen širok nabor kemikalij, in v empirično zbirko podatkov validacijske študije je vključenih 152 kemikalij, od tega 72 snovi in 80 zmesi (5). Ta preskusna metoda se uporablja za trdne snovi, tekočine, emulzije in gele. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijski študiji.

Preskusna metoda ICE se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, tj. kemikalij, ki jih je treba razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN (4). Ko se opredeljene omejitve za preskusno metodo ICE uporabljajo za ta namen, temeljijo na visokem deležu lažno pozitivnih rezultatov za alkohole ter lažno negativnih rezultatov za trdne in površinsko aktivne snovi (1) (3) (9). Vendar delež lažno negativnih rezultatov v tem okviru (kategorija 1 po GHS ZN, ki je opredeljena, kot da ni kategorija 1 po GHS ZN) ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, ki se izkažejo za negativne, naknadno preskusijo z drugimi ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali –kot zadnja možnost – s preskusom na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve, pri čemer se uporabi strategija zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov.

▼M7

Opozoriti je treba, da lahko trdne snovi pri Draizovem preskusu draženja oči *in vivo* povzročijo spremenljive in ekstremne pogoje izpostavljenosti, zaradi česar je napoved njihovega resničnega potenciala draženja lahko brezpredmetna (15). Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba pozitivni rezultat sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči, kar pomeni razvrstitev v kategorijo 1 po GHS ZN brez nadaljnjega preskušanja. Vendar je treba pozitivne rezultate, pridobljene z uporabo alkoholov, razlagati previdno, saj obstaja tveganje, da je njihova vrednost precenjena.

Kadar se preskusna metoda ICE uporablja za opredelitev kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN), je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN (4) (5), njena splošna točnost 86-odstotna (120/140), delež lažno pozitivnih rezultatov je 6-odstoten (7/113), delež lažno negativnih rezultatov pa 48-odstoten (13/27).

Preskusna metoda ICE se lahko uporabi tudi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na nevarnost draženja oči ali hudih poškodb oči v skladu s sistemom za razvrščanje GHS ZN (4). Preden se pri preskusni metodi ICE uporabi pristop od spodaj navzgor v okviru drugih sistemov za razvrščanje, se je treba posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi. Ta preskusna metoda se lahko uporabi za vse vrste kemikalij, pri čemer se lahko negativni rezultat sprejme, kot da ne razvršča kemikalije glede na draženje oči ali hude poškodbe oči. Vendar se lahko na podlagi enega rezultata iz validacijske zbirke podatkov vrednosti za barve, ki vsebujejo organsko topilo proti obraščanju, podcenijo (5).

Kadar se preskusna metoda ICE uporablja za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči, je v primerjavi s podatki preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih, razvrščenimi glede na sistem za razvrščanje GHS ZN (4) (5), njena splošna točnost 82-odstotna (125/152), delež lažno pozitivnih rezultatov je 33-odstoten (26/79), delež lažno negativnih rezultatov pa 1-odstoten (1/73). Kadar so iz zbirke podatkov izključene preskusne kemikalije iz določenih razredov (npr. organsko topilo proti obraščanju, ki ga vsebujejo barve), je točnost preskusne metode ICE glede na sistem za razvrščanje GHS ZN (4) (5) 83-odstotna (123/149), delež lažno pozitivnih rezultatov je 33-odstoten (26/78), delež lažno negativnih rezultatov pa 0-odstoten (0/71).

Preskusna metoda ICE ni priporočljiva za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot dražilne za oči (kategorija 2 ali kategorija 2A po GHS ZN), ali preskusnih kemikalij, ki jih je treba razvrstiti kot zmerno dražilne za oči (kategorija 2B po GHS ZN), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN razvrščenih prenizko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorije 2, 2A ali 2B po GHS ZN. Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrezno metodo.

Pri vseh postopkih na očeh piščancev je treba upoštevati veljavna pravila in postopke preskusnega laboratorija o ravnanju s človeškim ali živalskim materialom, kamor spadajo med drugim tudi tkiva in tkivne tekočine. Priporočajo se splošni previdnostni ukrepi za laboratorije (16).

Čeprav se pri preskusni metodi ICE ne proučujejo poškodbe veznice in šarenice, kot se ocenjuje pri preskusu draženja oči na kuncih, se obravnavajo učinki na roženico, ki so pomembno gonilo pri razvrščanju *in vivo* ob upoštevanju razvrščanja po GHS ZN. Čeprav s preskusno metodo ICE ni mogoče oceniti popravljivosti poškodb roženice kot take, je bilo na podlagi študij na očeh kuncev predlagano, da se lahko za opredelitev nekaterih vrst nepopravljivih učinkov uporabi ocena prvotne globine poškodbe roženice (17). Zlasti je potrebno

▼M7

nadaljnje znanstveno znanje, da bi razumeli, kako nastanejo nepopravljivi učinki, ki niso povezani z začetno hudo poškodbo. Treba je tudi opozoriti, da s preskusno metodo ICE ni mogoče oceniti potencialne sistemske toksičnosti, povezane z izpostavljenostjo oči.

Ta preskusna metoda se bo redno posodabljala ob upoštevanju novih informacij in podatkov. Kadar je potrebna popolnejša opredelitev poškodbe roženice, se je lahko uporabna na primer histopatologija. Za oceno te možnosti se uporabnikom priporoča, naj oči shranijo in pripravijo histopatološke vzorce, ki se lahko uporabijo pri ustvarjanju zbirke podatkov in oblikovanju meril za odločanje, s katerimi se lahko nadalje izboljša točnost te preskusne metode. OECD je pripravila dokument s smernicami za uporabo preskusnih metod *in vitro* za ugotavljanje toksičnosti za oči, ki vključuje podrobne postopke o zbirki histopatoloških vzorcev in informacije o tem, kam poslati vzorce in/ali histopatološke podatke (8).

Vsak laboratorij, ki ta preskus izvaja prvič, mora uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2. Laboratorij lahko te kemikalije uporabi, da dokaže svojo tehnično usposobljenost za izvajanje preskusne metode ICE, preden podatke o tej metodi predloži za namene regulativne razvrstitve glede na nevarnosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskusna metoda ICE je organotipski model, s katerim se piščančje oko za kratek čas ohrani *in vitro*. Pri tej preskusni metodi se poškodba, ki jo povzroči preskusna kemikalija, oceni tako, da se določijo nabreklost roženice, njena prepustnost in zadrževanje fluoresceina. Medtem ko se slednja parametra ocenjujeta kvalitativno, je treba nabreklost roženice oceniti kvantitativno. Vsaka meritev se bodisi pretvori v kvantitativni rezultat, ki se uporabi za izračun splošnega indeksa dražilnosti, bodisi kvalitativno razvrsti v kategorijo, ki se uporabi za razvrstitev glede na nevarnosti za oči *in vitro* kot kategorija 1 po GHS ZN ali brez kategorije po GHS ZN. Kateri koli od teh rezultatov se lahko uporabi za napoved, da je preskusna kemikalija zmožna povzročiti hude poškodbe oči *in vivo* ali da preskusne kemikalije ne bo treba razvrstiti glede na nevarnosti za oči (glej merila za odločanje). Vendar kemikalij, pri katerih se napove, da ne bodo povzročile hudih poškodb oči, ali ki glede na preskusno metodo ICE niso razvrščene (glej odstavek 11), ni mogoče razvrstiti.

Izvor in starost oči piščancev

Za ta preskus se običajno uporabljajo oči piščancev, ki so bili zaklani v klavnicah in namenjeni za človeško prehrano, kar pomeni, da poskusne živali niso potrebne. Uporabljajo se samo oči zdravih živali, primernih za vstop v prehransko verigo človeka.

Čeprav kontrolirana študija za ocenjevanje najprimernejše starosti piščancev ni bila opravljena, so se v preteklih preskusih po tej metodi uporabljali mladi piščanci, ki so bili zaklani v klavnicah (tj. piščanci, stari približno 7 tednov in težki od 1,5 do 2,5 kg).

Odvzem in prevoz oči v laboratorij

Glave se odstranijo neposredno po omamljanju piščancev, običajno z električnim šokom, in po izkrvavitvi zaradi prereza vratu. Piščanci morajo izhajati iz lokalnega vira v bližini laboratorija, tako da se njihove glave iz klavnice v laboratorij pripeljejo tako hitro, da se njihovo stanje čim manj poslabša in/ali čim bolj zmanjša možnost bakterijske okužbe. Čas od odvzema glav piščancev in vstavitve oči v komoro naprave za superfuzijo po odvzemu oči mora biti čim krajši (običajno manj kot dve uri), da se izpolnijo merila za sprejemljivost preskusa. Vse oči, uporabljene v preskusu, morajo pripadati isti skupini oči, odvzeti na določeni dan.

▼M7

Ker se oči secirajo v laboratoriju, se nepoškodovane glave iz klavnice v laboratorij prepeljejo pri sobni temperaturi (običajno med 18 °C in 25 °C) v plastičnih posodah, ki so navlažene s krpami, prepojenimi s fiziološko raztopino.

Merila za izbor in število oči, uporabljenih v preskusni metodi ICE

Oči z močno izhodiščno obarvanostjo s fluoresceinom (tj. > 0,5) ali motno roženico (tj. > 0,5) po odvzemu se zavržejo.

Vsaka tretirana skupina in sočasna pozitivna kontrola sta sestavljeni iz vsaj treh oči. Za negativno kontrolno skupino ali kontrolo s topilom (če se namesto fiziološke raztopine uporablja drugo topilo) se uporabi vsaj eno oko.

V primeru trdnih materialov, pri katerih se pojavi rezultat brez kategorije po GHS ZN, je priporočljiva druga ponovitev s tremi očmi, da se negativni rezultat potrdi ali zavrže.

POSTOPEK

Priprava oči

Veke se pazljivo odstranijo, pri čemer je treba paziti, da se ne poškoduje roženica. Celovitost roženice se hitro oceni tako, da se na njeno površino za nekaj sekund nanese kapljica 2-odstotnega (m/v) natrijevega fluoresceina, površina pa se nato spere s fiziološko raztopino. Oči, obdelane s fluoresceinom, se nato pregledajo z biomikroskopom s špranjsko svetilko, da se preveri, ali je roženica nepoškodovana (tj. zadrževanje fluoresceina in motnjava roženice ≤ 0,5).

Če je oko nepoškodovano, se izreže iz lobanje, pri čemer je treba paziti, da se roženica ne poškoduje. Zrklo se iz očesne votline potegne tako, da se žmurka trdno zagrabi s kirurškimi prijemalkami, očesne mišice pa se prerežejo z ukrivljenimi škarjami s topo konico. Tako se prepreči, da bi se roženica zaradi prevelikega tlaka poškodovala (tj. artefakti zaradi stisnjenja).

Ko se oko odstrani iz očesne votline, se ga mora še vedno držati viden del vidnega živca. Po odstranitvi iz očesne votline se oko položi na vpojno podlago, nato pa se odrežeta žmurka in preostalo vezno tkivo.

Izolirano oko se namesti v prijemalko iz nerjavnega jekla, tako da je roženica v navpičnem položaju. Prijemalka se nato prenese v komoro naprave za superfuzijo (18). Prijemalke je treba v napravi za superfuzijo namestiti tako, da kapljice fiziološke raztopine močijo celotno roženico (3 do 4 kapljice na minuto ali od 0,1 do 0,15 ml na minuto). Komore naprave za superfuzijo morajo imeti nadzorovano temperaturo, in sicer pri 32 ± 1,5 °C. V Dodatku 3 je diagram običajne naprave za superfuzijo s prijemalkami za oči, ki je na voljo na trgu, laboratoriji pa jo lahko izdelajo tudi sami. Naprava se lahko prilagodi potrebam posameznega laboratorija (tj. za različno število oči).

V napravi za superfuzijo se oči še enkrat pregledajo z biomikroskopom s špranjsko svetilko, s čimer se zagotovi, da se med seciranjem niso poškodovale. Pri tem se z nastavkom za merjenje globine na biomikroskopu na apeksu roženice izmeri tudi debelina roženice. Oči z (i) vrednostjo zadržanega fluoresceina > 0,5, (ii) motnjavo roženice > 0,5, ali (iii) dodatnimi znaki poškodb je treba zamenjati. Za oči, ki se na podlagi katerega koli od teh meril ne zavržejo, velja, da jih je treba vseeno zavreči, če se debelina roženice za več kot 10 % razlikuje od srednje vrednosti vseh oči. Uporabniki se morajo zavedati, da se lahko z biomikroskopi s špranjsko svetilko pri različnih širinah špranje pridobijo različne vrednosti meritev debeline roženice. Širino špranje je treba nastaviti na 0,095 mm.

▼M7

Po tem ko se vse oči pregledajo in odobrijo, se inkubirajo za približno 45 do 60 minut, da se pred odmerjanjem uravnotežijo s preskusnim sistemom. Po obdobju uravnoteženja se kot izhodiščna vrednost za debelino in motnjavo roženice zabeleži nična vrednost (tj. čas = 0). Vrednost fluoresceina, določena pri seciranju, se uporabi kot izhodiščna vrednost za to končno točko.

Uporaba preskusne kemikalije

Takoj po meritvi z ničnimi referenčnimi vrednostmi se oko (skupaj z držalom) vzame iz naprave za superfuzijo in položi vodoravno, nato pa se na roženico nanese preskusna kemikalija.

Tekoče preskusne kemikalije se običajno preskusijo nerazredčene, po potrebi pa se lahko tudi razredčijo (tj. kot del zasnove študije). Kot topilo pri razredčenih preskusnih kemikalijah se najpogosteje uporablja fiziološka raztopina. V nadzorovanih pogojih pa se lahko uporabijo tudi druga topila, vendar je ustreznost topil, ki niso fiziološka raztopina, treba dokazati.

Tekoče preskusne kemikalije se na roženico nanesejo tako, da je celotna površina roženice enakomerno prekrita z njimi, pri čemer je standardna količina 0,03 ml.

Če je mogoče, se trdne preskusne kemikalije čim bolj zdrobijo v terilnici s pestilom ali primerljivim orodjem za drobljenje. Prašek se nanese na roženico tako, da je njena površina enakomerno prekrita s preskusno kemikalijo, pri čemer je standardna količina 0,03 g.

Preskusna kemikalija (tekoča ali trdna) se pusti učinkovati 10 sekund, nato pa se z očesa spere s fiziološko raztopino (približno 20 ml) pri sobni temperaturi. Nato se oko (skupaj z držalom) ponovno vstavi v napravo za superfuzijo, in sicer v prvotnem, pokončnem položaju. Po potrebi se lahko dodatno spere po 10-sekundnem učinkovanju in v poznejših časovnih točkah (npr. v primeru odkritja ostankov preskusne kemikalije na roženici). V splošnem dodatno uporabljena količina fiziološke raztopine ni ključnega pomena, pač pa je pomembno to, ali se opazi oprijemanje kemikalije na roženico.

Kontrolne kemikalije

V vsak poskus je treba vključiti sočasno negativno kontrolo ali kontrolo s topilom/vehiklom ter pozitivne kontrole.

Pri preskušanju 100-odstotnih tekočin ali trdnih snovi se kot primerjalna negativna kontrola pri preskusni metodi ICE uporablja fiziološka raztopina, da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in da preskusni pogoji ne povzročajo neustreznih dražilnih reakcij.

Pri preskušanju razredčenih tekočin se v preskusno metodo vključi sočasna kontrolna skupina s topilom/vehiklom, da se odkrijejo nespecifične spremembe preskusnega sistema in da preskusni pogoji ne povzročajo neustreznih dražilnih reakcij. Kot je navedeno v odstavku 31, se lahko uporablja samo topilo/vehikel, za katerega je dokazano, da na preskusni sistem nima škodljivih učinkov.

V vsak poskus se kot sočasna pozitivna kontrola vključi znana dražilna snov za oči, da se preveri, ali se sproži želena reakcija. Ker se preskus ICE pri tej preskusni metodi uporablja za opredelitev jedkih ali zelo dražilnih snovi, je treba za pozitivno kontrolo uporabiti tako referenčno kemikalijo, ki pri tej preskusni metodi povzroči močno reakcijo. Da se lahko oceni variabilnost odziva pozitivne kontrole v daljšem časovnem obdobju pa stopnja močnega odziva ne

▼M7

sme biti prevelika. Za pozitivno kontrolo je treba pridobiti dovolj podatkov *in vitro*, da se lahko izračuna statistično opredeljeno sprejemljivo območje pozitivne kontrole. Če za določeno pozitivno kontrolo ni na voljo ustreznih podatkov o preskusni metodi ICE iz preteklih preskusov, je treba opraviti študije, v katerih se bodo ti podatki zbrali.

Primera pozitivnih kontrol za tekoče preskusne kemikalije sta 10-odstotna ocetna kislina ali 5-odstoten benzalkonijev klorid, primera pozitivnih kontrol za trdne preskusne kemikalije pa natrijev hidroksid in imidazol.

Primerjalne kemikalije so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

Merjene končne točke

Tretirane roženice se ocenijo pred tretiranjem in nato 30, 75, 120, 180 in 240 minut (± 5 minut) po spiranju, opravljenem po tretiranju. S temi časovnimi točkami se omogoči ustrezno število meritev med štiriurnim tretiranjem in hkrati zagotovi dovolj časa, da se oči med posameznimi meritvami ustrezno pregledajo.

Končne točke, ki se ocenijo, so motnjava in nabreklost roženice, zadrževanje fluoresceina in morfološki učinki (tj. luknjičavost ali odstopanje epitelija). Vse končne točke razen zadrževanja fluoresceina (ki se oceni samo pred tretiranjem in 30 minut po izpostavljenosti preskusni kemikaliji) se ocenijo pri vsaki od navedenih časovnih točk.

Priporoča se, da se motnjava roženice, zadrževanje fluoresceina, morfološki učinki in morebitni histopatološki izvidi dokumentirajo.

Po tem ko se po štirih urah opravi končni pregled, se uporabnikom priporoča, naj oči shranijo v ustrezni fiksirni raztopini (tj. v nevtralnem formalinskem pufru), da se lahko po potrebi opravi histopatološki pregled (za podrobnosti glej odstavek 14 in vir (8)).

Nabreklost roženice se določi na podlagi meritev debeline roženice, opravljenih z optičnim pahimetrom na biomikroskopu s špranjsko svetilko. Izrazi se v odstotkih in izračuna iz meritev debeline roženice z naslednjo formulo:

$$\left(\frac{\textit{debelina roženice v času } t - \textit{debelina roženice v času} = 0}{\textit{debelina roženice v času} = 0} \right) \times 100$$

Srednja odstotna vrednost nabreklosti roženice vseh preskusnih oči se izračuna za vse časovne točke opazovanja. Na podlagi najvišje srednje vrednosti nabreklosti roženice, kot je bila opažena v kateri koli časovni točki, se za vsako preskusno kemikalijo določi skupna vrednost za posamezno kategorijo (glej odstavek 51).

Pri oceni motnjave roženice se upošteva predel roženice, ki je pri beleženju rezultatov najbolj moten (glej preglednico 1). Za vse časovne točke opazovanja se izračuna srednja vrednost motnjave roženice vseh preskusnih oči. Na podlagi najvišje srednje vrednosti motnjave roženice, kot je bila opažena v kateri koli časovni točki, se za vsako preskusno kemikalijo določi skupna vrednost za posamezno kategorijo (glej odstavek 51).

▼M7

Preglednica 1

Vrednosti motnjave roženice

Vrednost	Opažanje
0	roženica ni motna
0,5	roženica zelo malo motna
1	posamična ali razpršena območja motnjave; podrobnosti šarenice jasno vidne
2	lahko razločljivo prosojno območje; podrobnosti šarenice rahlo zabrisane
3	zelo motna roženica; podrobnosti šarenice niso vidne; velikost zenice komaj razpoznavna
4	popolnoma motna roženica; šarenica ni vidna

Zadrževanje fluoresceina se oceni samo v časovni točki opazovanja po 30 minutah, kot je prikazano v preglednici 2. Nato se izračuna srednja vrednost zadržanega fluoresceina vseh preskusnih oči za časovno točko opazovanja po 30 minutah, ki se pri vsaki preskusni kemikaliji uporabi kot skupna vrednost za posamezno kategorijo (glej odstavek 51).

Preglednica 2

Vrednost zadržanega fluoresceina

Vrednost	Opažanje
0	ni zadržanega fluoresceina
0,5	zelo malo zadržanega fluoresceina v posameznih celicah
1	posamezne celice z nekaj fluoresceina, razpršene po tretiranem predelu roženice
2	točkaste ali zlite celice z veliko fluoresceina
3	velika zlita področja roženice, v katerih se zadržuje fluorescein

Morfološki učinki vključujejo „luknjičaste“ epitelne celice roženice, epitelij, ki odstopa, „grobo“ roženično površino in „prilepljenost“ preskusne kemikalije na roženico. Te ugotovitve so lahko različno resne in se lahko pojavijo istočasno. Razvrščanje teh ugotovitev poteka subjektivno v skladu z razlago raziskovalca.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Rezultate za motnjavo in nabreklost roženice ter zadrževanje fluoresceina je treba oceniti ločeno, da se ustvari razred ICE za vsako končno točko. Razredi ICE za vsako končno točko se nato združijo, da se vsaka preskusna kemikalija lahko razvrsti v razred dražilnosti.

Merila za odločanje

Po oceni vsake končne točke se na podlagi vnaprej določenega območja določijo razredi ICE. Pri razlagi debeline roženice (preglednica 3), motnjave roženice (preglednica 4) in zadrževanja fluoresceina (preglednica 5) se uporabljajo štirje razredi ICE v skladu z spodnjimi lestvicami. Opozoriti je treba, da so vrednosti

▼M7

nabreklosti roženice iz preglednice 3 uporabne le, če je debelina izmerjena z biomikroskopom s špranjsko svetilko (npr. z modelom Haag-Streit BP900) z napravo za merjenje globine št. 1 in nastavitvijo širine špranje na $9\frac{1}{2}$, kar ustreza 0,095 mm. Uporabniki se morajo zavedati, da se lahko z biomikroskopi pri različnih širinah špranje pridobijo različne vrednosti meritev debeline roženice.

Preglednica 3

Merila ICE za razvrstitev glede na nabreklost roženice

Srednja nabreklost roženice (v %) (*)	Razred ICE
0 do 5	I
> 5 do 12	II
> 12 do 18 (> 75 min po tretiranju)	II
> 12 to 18 (≤ 75 min po tretiranju)	III
> 18 do 26	III
> 26 do 32 (> 75 min po tretiranju)	III
> 26 to 32 (≤ 75 min po tretiranju)	IV
> 32	IV

(*) Najvišja srednja vrednost, ki se opazi pri kateri koli časovni točki.

Preglednica 4

Merila ICE za razvrstitev motnjave roženice

Najvišja srednja vrednost motnjave (*)	Razred ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Najvišja srednja vrednost, ki se opazi pri kateri koli časovni točki (na podlagi vrednosti motnjave iz preglednice 1).

Preglednica 5

Merila ICE za razvrstitev glede na srednjo vrednost zadržanega fluoresceina

Srednja vrednost zadržanega fluoresceina 30 minut po tretiranju (*)	Razred ICE
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Na podlagi vrednosti iz preglednice 2.

Razvrstitev preskusne kemikalije *in vitro* se oceni na podlagi razvrstitve po GHS ZN, ki ustreza kombinaciji kategorij, pridobljenih za nabreklost in motnjavo roženice ter zadrževanje fluoresceina, kot je navedeno v preglednici 6.

▼M7

Preglednica 6

Splošne razvrstitve *in vitro*

Razvrstitev po GHS ZN	Kombinacije treh končnih točk
brez kategorije	3 × I 2 × I, 1 × II
napoved ni mogoča	druge kombinacije
kategorija 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) motnjava roženice ≥ 3 po 30 min (pri vsaj dveh očeh) motnjava roženice = 4 pri kateri koli časovni točki (pri vsaj dveh očeh) epitelij močno odstopa (pri vsaj enem očesu)

(*) Manj pogoste kombinacije.

Merila za sprejemljivost študije

Preskus se šteje za sprejemljivega, če so sočasne negativne kontrole ali kontrole z vehiklom/topilom opredeljene kot brez kategorije po GHS ZN, sočasne pozitivne kontrole pa kot kategorija 1 po GHS ZN.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki, če so pomembni za izvedbo študije:

Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:

— kemijska imena, na primer strukturno ime, ki ga uporablja Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana;

— registrska številka CAS (RN), če je znana;

— čistost in sestava preskusne/kontrolne kemikalije (v masnih odstotkih), če so ti podatki na voljo;

— fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, npr. agregatno stanje, vrednost pH, stabilnost, kemijski razred, topnost v vodi;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost, če je znana.

Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju:

— ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;

— podatki o viru oči (npr. obrat, v katerem so bile odvzete).

Pogoji preskusne metode:

— opis uporabljenega preskusnega sistema;

▼M7

— uporabljeni biomikroskop s špranjsko svetilko (npr. model) in nastavitve tega uporabljenega instrumenta;

— sklic na rezultate negativnih in pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov in, če je ustrezno, podatki iz preteklih preskusov, ki dokazujejo sprejemljiva območja sočasne primerjalne kontrole;

— postopek, ki se je uporabil za zagotavljanje celovitosti (tj. točnosti in zanesljivosti) preskusne metode v daljšem časovnem obdobju (npr. redno preskušanje kemikalij za preverjanje usposobljenosti).

Zbiranje in priprava oči:

— teža in starost živali darovalke in druge posebne značilnosti živali, od katerih so bile pridobljene oči (npr. spol, sev), če so na voljo;

— pogoji hranjenja in prevoza oči (npr. datum in čas odvzema oči, čas od odvzema glav piščancev do vstavitve odvzetih oči v komoro naprave za superfuzijo);

— priprava in namestitev oči, vključno z izjavami glede njihove kakovosti, temperature komor za oči in merili za izbiro oči, uporabljenih za preskušanje.

Preskusni postopek:

— uporabljeno število ponovitev;

— opredelitev uporabljenih negativnih in pozitivnih kontrol (če je ustrezno, tudi kontrole s topilom in primerjalne kontrole);

— odmerek preskusne kemikalije, nanašanje in čas izpostavljenosti;

— časovne točke opazovanja (pred tretiranjem in po njem);

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

— preglednice s podatki o nabreklosti in prepustnosti roženice ter vrednosti zadržanega fluoresceina, pridobljeni za vsako posamezno oko in pri vsaki časovni točki opazovanja, vključno s srednjimi vrednostmi pri vsaki točki opazovanja za vse preskušene oči;

— najvišja ugotovljena srednja vrednost (v kateri koli časovni točki) nabreklosti in motnjave roženice ter vrednosti zadrževanja fluoresceina ter njena povezava z razredom ICE;

— opis vseh drugih opaženih učinkov;

— izpeljana razvrstitev po GHS ZN *in vitro*;

— fotografije oči, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

▼M7

VIRI

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 07-4517. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Na voljo na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH št. publikacije: 10-7553A. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) Združeni narodi (ZN) (2011). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), četrta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2011. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment št. 188 (Dela 1 in 2), OECD, Pariz.

(6) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.

(7) Scott, L., Eskes, C., Hoffman, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Hamernik, K., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., Mcnamee, P., Osborn, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba, K., Vassallo, M., Van den Berghe, C., Van Goethem. F., Vinardell, P. in Zuang, V. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro,* zv. 24, str. 1–9.

(8) OECD (2011). Guidance Document on „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160“, OECD, Pariz.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH št. publikacije: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Na voljo na: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

(10) Prinsen, M. K. in Koëter, B. W. M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31: 69–76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, str. 13. Na voljo na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P. A., Bruner, L. H. in Spielmann, H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro,* 9: 871–929.

(13) Prinsen, M. K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34: 291–296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S. C., Gautheron, P. in Prinsen, M. K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35: 23–37.

(15) Prinsen, M. K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20: 78–81.

(16) Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. in Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Na voljo na: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J. K., Parker, R. D. in Jester, J. V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36: 106–117.

(18) Burton, A. B. G., York, M. in Lawrence, R.S. (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.* 19, str. 471–480.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode.

Primerjalna kemikalija: kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir; (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušanega razreda, (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti, (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu želenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

Motnjava roženice: merjenje stopnje motnjave roženice po izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Povečana motnjava roženice pomeni, da je roženica poškodovana.

Nabreklost roženice: objektivna meritev stopnje raztezanja roženice pri preskusu ICE po izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Izražena je kot odstotek, izračuna pa se iz meritev osnovne debeline roženice (pred odmerkom) in debeline, zabeležene v rednih intervalih po izpostavljenosti preskusni kemikaliji v preskusu ICE. Stopnja nabreklosti roženice je kazalnik poškodbe roženice.

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in „kategorijo 2 po GHS ZN“ (4).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Zadrževanje fluoresceina: subjektivna meritev stopnje natrijevega fluoresceina pri preskusu ICE, ki se zadrži v celicah epitelija v roženici po izpostavitvi preskusni kemikaliji. Stopnja zadržanega fluoresceina je kazalnik poškodb epitelija roženice.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki ob izpostavljenosti temu sredstvu lahko povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Nepopravljivi učinki na oči: glej „Huda poškodba oči“ in „Kategorija 1 po GHS ZN“.

▼M7

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (4).

Negativna kontrola: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2 po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za „brez kategorije po GHS ZN“.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja močnega odziva ne sme biti prevelika.

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti.

Popravljivi učinki na oči: glej „Draženje oči“ in „Kategorija 2 po GHS ZN“.

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in „kategorijo 1 po GHS ZN“ (4).

Biomikroskop s špranjsko svetilko: instrument, ki se uporablja za neposredno preiskavo očesa in ki skupaj z binokularnim mikroskopom tvori pokončno stereomikroskopsko sliko. Pri preskusni metodi ICE se ta instrument uporablja za vpogled v sprednje strukture očesa piščanca ter za objektivno merjenje debeline roženice z nastavkom za merjenje globine.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (4).

Površinsko aktivna snov: je snov, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo.

▼M7

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (4).

Kategorija 1 po GHS ZN: glej „Huda poškodba oči“ in/ali „Nepopravljivi učinki na oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN: glej „Draženje oči“ in/ali „Popravljivi učinki na oči“.

Brez kategorije po GHS ZN: snovi, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN. Ta pojem je sopomenka za „brez razvrstitve“.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen.

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti kemikalije.

▼M7

Dodatek 2

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI ZA PRESKUSNO METODO ICE

Pred redno uporabo te preskusne metode, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno opredelijo razvrstitev glede na nevarnosti za oči za 13 kemikalij, priporočenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih za oči, temeljijo pa na rezultatih preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (TG 405) in sistemu za razvrščanje GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (4) (6). Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in visokokakovostni podatki *in vitro* iz metode ICE. Referenčni podatki so na voljo v dokumentu s povzetkom (5) ter dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusne metode ICE (9).

Preglednica 1

Priporočene kemikalije za dokazovanje tehnične usposobljenosti za ICE

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Agregatno stanje	Razvrstitev *in vivo* (2)	Razvrstitev *in vitro* (3)
benzalkonijev klorid (5-odstotni)	8001-54-5	onijska spojina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
klorheksidin	55-56-1	amin, amidin	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
dibenzoil-L-vinska kislina	2743-38-6	karboksilna kislina, ester	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
imidazol	288-32-4	heterociklična spojina	trdna snov	kategorija 1	kategorija 1
triklorocetna kislina (30-odstotna)	76-03-9	karboksilna kislina	tekočina	kategorija 1	kategorija 1
2,6-diklorobenzoil klorid	4659-45-4	kislinski halid	tekočina	kategorija 2A	napoved ni mogoča (4)
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna snov	kategorija 2A (5)	napoved ni mogoča (4)
etil-2-metil acetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekočina	kategorija 2B	napoved ni mogoča (4)
dimetil sulfoksid	67-68-5	organska žveplova spojina	tekočina	brez kategorije	brez kategorije
glicerol	56-81-5	alkohol	tekočina	brez kategorije	brez kategorije (mejno)
metilciklopentan	96-37-7	ogljikovodik (ciklični)	tekočina	brez kategorije	brez kategorije
n-heksan	110-54-3	ogljikovodik (aciklični)	tekočina	brez kategorije	brez kategorije

▼**M7**

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	Razvrstitev *in vivo* ([2])	Razvrstitev *in vitro* ([3])
triacetin	102-76-1	lipid	tekočina	ni razvrščen	brez kategorije

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS)

([1]) Vsaki preskusni kemikaliji so bili dodeljeni kemijski razredi, pri čemer se je uporabil standardni sistem za razvrščanje, ki temelji na sistemu za razvrščanje MeSH (na voljo na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Na podlagi rezultatov preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (OECD TG 405) in z uporabo GHS ZN (4) (6).

([3]) Na podlagi rezultatov pri preskusni metodi ICE, kot so opisani v preglednici 6.

([4]) Kombinacija rezultatov preskusne metode ICE, ki niso opisani v preglednici 6, za opredelitev snovi brez kategorije ali kategorije 1 po GHS ZN (glej preglednico 6).

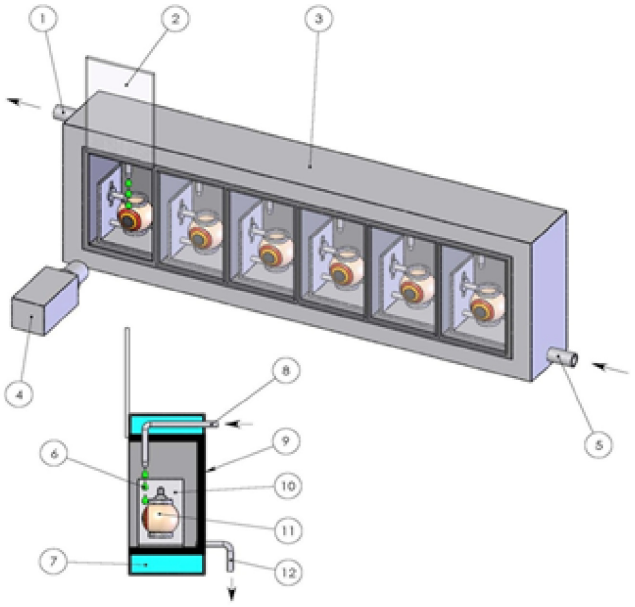
([5]) Razvrščanje v kategorijo 2A ali 2B je odvisno od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene 3 živali. Vse končne točke, razen rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je rdečina veznice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deseti dan.

▼M7

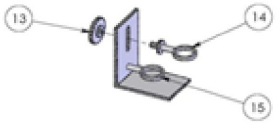
Dodatek 3

DIAGRAMI NAPRAVE ZA SUPERFUZIJO IN PRIJEMALK ZA OČI PRI ICE

(Za dodatne splošne opise naprave za superfuzijo in prijemalk za oči glej Burton idr. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Št. dela	Opis	Št. dela	Opis
1	odvod tople vode	9	predelek
2	drsna vratca	10	držalo za oči
3	naprava za superfuzijo	11	oko piščanca
4	instrument za optično merjenje	12	odvod fiziološke raztopine
5	dovod tople vode	13	nastavni vijak
6	fiziološka raztopina	14	prilagodljiva zgornja opora
7	topla voda	15	fiksna spodnja opora
8	dovod fiziološke raztopine		

▼M7

B.49 *IN VITRO* PRESKUS MIKRONUKLEUSOV NA CELICAH SESALCEV

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 487 (2016).Je del sklopa preskusnih metod o genetski toksikologiji. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnate informacije o preskušanju v zvezi z genetsko tokskikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (1).

In vitro preskus mikronukleusov je preskus genotoksičnosti za odkrivanje mikronukleusov v citoplazmi celic v interfazi. Mikronukleusi lahko izvirajo iz acentričnih fragmentov kromosomov (kar pomeni, da so brez centromere) ali celih kromosomov, ki med anafazo celične delitve ne morejo potovati na pole. Zato je ta preskus metoda, ki zagotavlja celovito podlago za *in vitro* preiskovanje potenciala za povzročitev poškodb kromosomov, saj se lahko v celicah, pri katerih je med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali po njej prišlo do delitve celic, zaznajo anevgene in klastogene snovi (2) (3) (za več podrobnosti glej odstavek 13). V mikronukleusih je vidna poškodba, ki se je prenesla na hčerinske celice, medtem ko se kromosomske aberacije v celicah v metafazi ne morejo prenesti. V vsakem primeru spremembe morda niso združljive s preživetjem celic.

Pri tej preskusni metodi je mogoče uporabiti protokole z inhibitorjem polimerizacije aktina citohalazinom B ali brez njega. Zaradi dodatka citohalazina B pred mitozo nastanejo celice z dvema jedroma, kar omogoča opredelitev in analizo mikronukleusov le v tistih celicah, v katerih se je zaključila ena mitoza (4) (5). S to preskusno metodo je tudi mogoče uporabiti protokole brez citokinetskega bloka, če obstajajo dokazi, da se je pri analizirani celični populaciji zaključila mitoza.

Poleg uporabe *in vitro* preskusa mikronukleusov za opredelitev kemikalij, ki spodbujajo nastanek mikronukleusov, se lahko dodatne informacije o mehanizmih poškodb kromosomov in nastanka mikronukleusov pridobijo tudi z imunokemijskim označevanjem kinetohorov ali hibridizacijo s centromerno/telomerno sondo (fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH)) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Navedena postopka označevanja in hibridizacije se lahko uporabita v primeru povečanega nastajanja mikronukleusov, ko želi raziskovalec ugotoviti, ali je povečanje nastalo zaradi klastogenih in/ali anevgenih dogodkov.

Ker se mikronukleusi v celicah v interfazi lahko ocenjujejo razmeroma objektivno, morajo zaposleni v laboratoriju določiti število celic z dvema jedroma samo, ko se uporabi citohalazin B, pojavnost celic z mikronukleusi pa v vseh primerih. Zato se lahko rezultati preparatov sorazmerno hitro zabeležijo, analiza pa je lahko avtomatizirana. Zaradi tega se lahko pri vsakem tretiranju praktično oceni na tisoče namesto na stotine celic, s čimer se poveča moč preskusa. Ker lahko mikronukleusi nastanejo iz zaostalih kromosomov, obstaja možnost zaznavanja snovi, ki povzročajo anevploidijo in se pri klasičnih preskusih kromosomskih aberacij težko proučujejo, gl. npr. Poglavje B.10 te priloge (18). Vendar *in vitro* preskus mikronukleusov, kot je opisan v tej preskusni metodi, ne omogoča razlikovanja med kemikalijami, ki povzročajo spremembe števila kromosomov in/ali ploidijo, in tistimi, ki povzročajo klastogenost, brez posebnih tehnik, kot je fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH), omenjena v odstavku 4.

In vitro preskus mikronukleusov je zanesljiv in se lahko izvaja na različnih vrstah celic ter ob prisotnosti ali odsotnosti citohalazina B. Veljavnost *in vitro* preskusa mikronukleusov (MNvit), pri katerem se uporabljajo različne vrste celic (kulture celičnih linij ali primarne celične kulture), je mogoče podpreti z obsežnimi podatki (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Ti vključujejo zlasti mednarodne validacijske študije, ki jih usklajuje Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21)

▼M7

(22) (23), ter poročila International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Razpoložljivi podatki so bili tudi ponovno ocenjeni v retrospektivni validacijski študiji, ki temelji na zanesljivosti dokazov, ki jo je izvedel Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM) Evropske komisije, Znanstveni svetovalni odbor ECVAM (ESAC) pa je preskusno metodo potrdil kot znanstveno veljavno (37) (38) (39).

Pri *in vitro* preskusu mikronukleusov se lahko uporabijo kulture celičnih linij ali primarne celične kulture človeškega ali glodalskega izvora. Ker pogostost mikronukleusov v ozadju vpliva na občutljivost preskusa, je priporočljivo uporabljati celične vrste s stabilno in opredeljeno pogostostjo nastajanja mikronukleusov v ozadju. Uporabljene celice se izberejo glede na njihovo zmožnost dobre rasti v kulturi, stabilnost kariotipa (vključno s kromosomskim številom) in pogostnost spontanih mikronukleusov (40). Na podlagi razpoložljivih podatkov za zdaj ni mogoče navesti trdnih priporočil, vendar je iz njih razvidno, da je treba pri ocenjevanju kemične nevarnosti upoštevati status beljakovine *p53*, gensko stabilnost (stabilnost kariotipa), sposobnost popravljanja DNK in izvor (glodalski/človeški) celic, izbranih za preskušanje. Uporabnikom te preskusne metode se torej priporoča, naj upoštevajo vpliv te in drugih lastnosti celic na uspešnost celične linije pri odkrivanju indukcije kromosomskih aberacij, medtem ko se razvija znanje na tem področju.

Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije, razen če so celice v zvezi s preskusno kemikalijo sposobne presnavljanja. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi lahko povzročili lažno pozitivne rezultate, ki ne odražajo genotoksičnosti preskusnih kemikalij. Med take pogoje so vključene spremembe vrednosti pH (41) (42) (43) ali osmolarnosti, medsebojno delovanje s sestavinami celičnega gojišča (44) (45) ali previsoke ravni citotoksičnosti (glej odstavek 29).

Pri analizi nastanka mikronukleusov je bistveno, da mitoza poteče tako v tretiranih kot tudi netretiranih kulturah. Glede štetja mikronukleusov se največ podatkov pridobi s celicami, v katerih se je med tretiranjem s preskusno kemikalijo ali po njej zaključila ena mitoza. Pri proizvedenih nanomaterialih so potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSA

Človeške celične kulture ali celične kulture drugih sesalcev so preskusni kemikaliji izpostavljene z zunanjim virom presnovne aktivacije ali brez njega, razen če so uporabljene celice z ustrezno sposobnostjo metabolizma (glej odstavek 19).

Med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji in po njej se celice gojijo dovolj dolgo, da so mogoči poškodba kromosomov ali drugi učinki na celični cikel/delitev celic, kar povzroči nastanek mikronukleusov v celicah v interfazi. Za nastanek anevploidije mora biti običajno preskusna kemikalija prisotna med mitozo. Odvzete in obarvane celice v interfazi se analizirajo na prisotnost mikronukleusov. Mikronukleuse je treba po možnosti šteti samo v tistih celicah, v katerih se je mitoza zaključila med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali

▼M7

v morebitnem obdobju po tretiranju. V kulturah, tretiranih z zaviralcem citokineze, se to zlahka doseže tako, da se štejejo le celice z dvema jedroma. Če se zaviralec citokineze ne uporabi, je treba dokazati, da se je v analiziranih celicah najverjetneje zaključila delitev celic, in sicer na podlagi povečanja celične populacije med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali po njej. Pri vseh protokolih je treba dokazati, da je do celične proliferacije prišlo tako v kontrolnih kot tudi tretiranih kulturah, v vseh kulturah, pri katerih se štejejo mikronukleusi, pa je treba oceniti obseg citotoksičnosti ali citostaze, ki je nastala zaradi preskusne kemikalije.

OPIS METODE

Celice

Uporabijo se lahko gojeni primarni limfociti periferne krvi človeka ali drugih sesalcev (7) (20) (46) (47) in številne celične linije glodalcev, kot so celice CHO, V79, CHL/IU in L5178Y, ali človeške celične linije, kot je TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (glej odstavek 6). Pri preskušanju mikronukleusov so bile uporabljene tudi druge celične linije, kot so HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), celice HepG2 (52) (53), A549 in primarne embrionalne celice sirijskega hrčka (54), vendar zaenkrat še niso obširno validirane. Zato je treba uporabo navedenih celičnih linij in vrst utemeljiti na podlagi njihove dokazane učinkovitosti v preskusu, kot je opisano v oddelku o merilih za sprejemljivost. Poročalo se je o morebitnem vplivu citohalazina B na rast celic L5178Y, zato s to celično linijo ni priporočljiv (23). Pri uporabi primarnih celic je treba zaradi dobrobiti živali razmisliti o uporabi človeških primarnih celic, če je to izvedljivo, ter jih vzorčiti v skladu s človeškimi etičnimi načeli in predpisi.

Limfocite periferne krvi človeka je treba pridobiti od mladih oseb (starih med približno 18 in 35 let), ki ne kadijo, nimajo znanih bolezni ali niso bili nedavno izpostavljeni takim stopnjam genotoksičnih snovi (npr. kemikalijam, ionizirajočemu sevanju), zaradi katerih bi se povečala pojavnost celic z mikronukleusi v ozadju. Tako se zagotovi, da je pojavnost celic z mikronukleusi v ozadju nizka in konsistentna. Osnovna pojavnost celic z mikronukleusi se povečuje s starostjo in ta trend je izrazitejši pri ženskah kot pri moških (55). Če se za uporabo zberejo celice več kot enega darovalca, je treba navesti število darovalcev. Prikazati je treba, da so se celice delile od začetka tretiranja s preskusno kemikalijo do njihovega vzorčenja. Celične kulture se vzdržujejo v eksponentni fazi rasti celic (celične linije) ali se stimulira njihova delitev (primarne kulture limfocitov), da se izpostavijo celice v različnih fazah celičnega cikla, saj morda ni znano, kako so posamezne faze celičnega cikla občutljive na preskusne kemikalije. Primarne celice, katerih delitev je treba stimulirati z mitogeni, med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji v splošnem niso več sinhronizirane (npr. človeški limfociti po 48-urni stimulaciji z mitogeni). Uporaba sinhroniziranih celic med tretiranjem s preskusno kemikalijo ni priporočljiva, vendar je lahko sprejemljiva, če se utemelji.

Gojišča in pogoji kultiviranja

Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO_2, če je ustrezno, temperatura inkubacije 37 °C). Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo; celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celičnih linij ali primarnih kultur, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic.

▼M7

Priprava kultur

Celične linije: celice se namnožijo iz osnovnih kultur, nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju še naprej eksponentno rastejo do odvzema celic (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

Limfociti: celotna kri, obdelana z antikoagulantom (npr. heparinom), ali ločeni limfociti se dodajo v gojišče (človeški limfociti npr. za 48 ur), ki vsebuje mitogen (za človeške limfocite npr. fitohemaglutinin), da se spodbudi delitev celic pred izpostavitvijo preskusni kemikaliji in citohalazinu B.

Presnovna aktivacija

Pri uporabi celic z neustrezno notranjo sposobnostjo presnavljanja je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogosteje uporabljani sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni utemeljen drug sistem, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodalcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (56) (57), ali z mešanico fenobarbitala in b–naftoflavona (58) (59) (60). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (61) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (58) (59) (60). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Med tretiranjem se je treba izogibati kemičnim izdelkom, ki zmanjšujejo mitotični indeks, zlasti snovem, ki tvorijo kalcijev kompleks (62). Na izbiro vrste in koncentracije zunanjega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred kemikalij, ki se preskušajo.

Priprava preskusne kemikalije

Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in, če je ustrezno, razredčiti. Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (63) (64) (65). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preskusni pogoji

Topila

Izbrati je treba tako topilo, ki optimizira topnost preskusnih kemikalij in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, tj. ne spremeni rast celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid (DMSO). Organska topila v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %. Če se citohalazin B raztopi v DMSO, skupna količina organskega topila, ki se uporabi za preskusno kemikalijo in citohalazin B, ne sme presegati 1 vol. %; v nasprotnem primeru je treba uporabiti netretirane kontrole, da se zagotovi, da odstotek organskega topila nima škodljivega učinka. Vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) v končnem obdelovalnem gojišču ne smejo presegati 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali

▼M7

aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusno kemikalijo in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba vključiti netretirane kontrole (glej Dodatek 1) ter kontrole s topilom, ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali kromosomskih učinkov (npr. anevploidije ali klastogenosti).

Uporaba citohalazina B kot zaviralca citokineze

Eden od najpomembnejših dejavnikov za uspešno izvedbo *in vitro* preskusa mikronukleusov je zagotavljanje, da se je v celicah, ki se štejejo, med tretiranjem ali v morebitnem obdobju inkubacije po tretiranju zaključila mitoza. Zato mora biti štetje mikronukleusov omejeno na celice, v katerih med tretiranjem ali po njem potekla mitoza. Citohalazin B je snov, ki se najpogosteje uporablja za zaviranje citokineze, saj zavira sestavljanje aktina in tako preprečuje ločevanje hčerinskih celic po mitozi, zaradi česar nastanejo celice z dvema jedroma (6) (66) (67). Kadar se uporabi citohalazin B, se lahko sočasno meri učinek preskusne kemikalije na kinetiko celične proliferacije. Citohalazin B je treba kot zaviralec citokineze uporabljati takrat, ko se uporabljajo človeški limfociti, saj se trajanje celičnih ciklov med različnimi darovalci razlikuje in se vsi limfociti ne odzivajo na stimulacijo s fitohemaglutininom (PHA). Ni pa obvezen za druge vrste celic, če se lahko ugotovi, da je v njih prišlo do delitve, kot je opisano v odstavku 27. Poleg tega se citohalazin B običajno ne uporablja, ko se v vzorcih ocenijo mikronukleusi z uporabo pretočnih citometričnih metod.

Laboratorij mora za vsako vrsto celic določiti ustrezno koncentracijo citohalazina B, da se doseže optimalna pogostost celic z dvema jedroma v kontrolnih kulturah s topilom, in dokazati je treba, da nastaja dober prirast celic z dvema jedroma za štetje. Ustrezna koncentracija citohalazina B je običajno od 3 do 6 μg/ml (19).

Merjenje celične proliferacije in citotoksičnosti ter izbira koncentracij za tretiranje

Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 29), obarjanje v gojiščih (glej odstavek 30) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 9). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufra v končno obdelovalno gojišče, da se izogne lažno pozitivnim rezultatom in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

Z meritvami celične proliferacije se zagotovi, da med preskusom poteka mitoza v zadostnem številu tretiranih celic in da se tretiranja izvedejo pri ustreznih ravneh citotoksičnosti (glej odstavek 29). Citotoksičnost je treba določiti v glavnem preskusu s presnovno aktivacijo ali brez nje ter pri tem uporabiti ustrezen kazalnik celične smrti in rasti (glej odstavka 26 in 27). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem predhodnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Če se izvede, ne sme nadomestiti merjenja citotoksičnosti v glavnem preskusu.

Tretiranje kultur s citohalazinom B in merjenje relativne pogostosti celic z enim, dvema ali več jedri v kulturi zagotavljata natančno metodo za količinsko opredelitev učinka na proliferacijo celic in citotoksično ali citostatično delovanje tretiranja (6) ter zagotavljata, da so pod mikroskopom preštete samo celice, pri katerih je prišlo do delitve med tretiranjem ali po njem. Za oceno citotoksičnega in citostatičnega delovanja tretiranja je priporočljivo uporabiti proliferacijski

▼M7

indeks citokinetskega bloka (cytokinesis-block proliferation index – CBPI) (6) (27) (68) ali indeks pomnoževanja (Replication Index – RI) vsaj 500 celic na kulturo (glej Dodatek 2 za formule), tako da se primerjajo vrednosti v tretirani in kontrolni kulturi. Z oceno drugih znakov citotoksičnosti (npr. celična neokrnjenost, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi, celični cikel) se lahko pridobijo uporabne informacije, vendar se ne sme uporabiti namesto proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka ali indeksa pomnoževanja.

V študijah brez citohalazina B je treba prikazati, da so se celice v kulturi delile, tako da je v precejšnjem deležu štetih celic prišlo do delitve med tretiranjem s preskusno kemikalijo ali po njem, sicer lahko nastanejo lažno negativni odzivi. Za oceno citotoksičnega in citostatičnega učinkovanja tretiranja se priporoča merjenje relativne podvojitve populacije ali relativnega povečanja števila celic (17) (68) (69) (70) (71) (glej Dodatek 2 za formule). Pri daljših časih izpostavljenosti (npr. tretiranje, ki traja od 1,5 do 2 dolžini normalnega celičnega cikla, in odvzem po dodatnih 1,5 do 2 dolžinah normalnega celičnega cikla, kar vodi do časov vzorčenja, daljših od 3 do 4 dolžine normalnega celičnega cikla skupaj, kot je opisano v odstavkih 38 in 39) se lahko pri relativni podvojitvi populacije vrednost citotoksičnosti podceni (71). V tem primeru je boljše merilo relativno povečanje števila celic ali pa je v pomoč ocena citotoksičnosti po 1,5 do 2 dolžinah normalnega celičnega cikla. Ocena drugih označevalcev citotoksičnosti ali citostaze (npr. celična neokrnjenost, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi, indeks proliferacije, celični cikel, nukleoplazmatski mostički in jedrni brsti) lahko zagotovi uporabne dodatne informacije, vendar se ne sme uporabiti namesto proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka ali indeksa pomnoževanja.

Oceniti je treba vsaj tri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Ne glede na vrsto celic (celične linije ali primarne kulture limfocitov) se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji tretira ponovitev kulture ali le ena sama kultura. Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, je sprejemljiva tudi ena sama kultura, če je skupno število celic v eni kulturi ali ponovitvah kulture enako. Uporaba ene kulture je pomembna zlasti takrat, ko se ocenjujejo več kot 3 koncentracije (glej odstavka 44 in 45). Za analizo podatkov se lahko zberejo rezultati, pridobljeni iz neodvisnih ponovitev kulture pri določeni koncentraciji. Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, bodo ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje iz navedene nastale citotoksičnosti, kot je opisano v odstavku 29, ter vključevati koncentracije, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za pridobitev podatkov za nizko in zmerno citotoksičnost ali podrobno proučevanje razmerja med odzivom in odmerkom uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in/ali več kot tri koncentracije (ena kultura ali ponovitve kulture), zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 60).

Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati, da citotoksičnost ne preseže razpona 55 ± 5 %, pri čemer se uporabljajo priporočeni parametri citotoksičnosti (tj. zmanjšanje relativnega povečanja števila celic in relativne podvojitve populacije za celične linije, ko se citohalazin B ne doda, ter zmanjšanje proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka ali indeksa pomnoževanja, ko se citohalazin B doda, na razpona 45 ± 5 % sočasne negativne kontrole) (72). Pozitivne rezultate, ki se nahajajo le na višjem koncu tega razpona citotoksičnosti, ki znaša 55 ± 5 %, je treba razlagati previdno (71).

▼M7

Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa (npr. barvanje ali štetje). Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.

Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 μl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (73) (74) (75). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so npr. snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB) (76), okoljski ekstrakt itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (93).

Kontrole

V vsak odvzem celic je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 21), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.

Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokaže zmožnost laboratorija, da odkrije klastogene in anevgene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, ter učinkovitost zunanjega sistema presnovne aktivacije (če je ustrezno). Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge kemikalije, če je to utemeljeno.

Trenutno niso znani nobeni anevgeni, ki bi za svojo genotoksično delovanje potrebovali presnovno aktivacijo (17). Ker so preskusi genske toksičnosti *in vitro* za celice sesalcev dovolj standardizirani za kratkotrajna tretiranja, ki se izvedejo sočasno s presnovno aktivacijo in brez nje ter z enakim trajanjem tretiranja, je uporaba pozitivnih kontrol lahko omejena na klastogen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam klastogen odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost metabolnega sistema kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (brez S9) uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Če se pri kratkotrajnem tretiranju s presnovno aktivacijo in brez nje za eno samo pozitivno kontrolo izbere klastogen, je treba pri dolgotrajnem tretiranju brez presnovne aktivacije izbrati anevgen. V celicah, ki so sposobne presnavljanja in ne potrebujejo S9, je treba za klastogenost in anevgenost uporabiti pozitivne kontrole.

Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema (kar pomeni, da so učinki jasni, vendar pri odčitavanju ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov), odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi presegla meje, določene za to preskusno metodo.

▼M7

Preglednica 1

Referenčne kemikalije, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Kemikalija	Št. CAS
1. **Klastogeni, aktivni brez presnovne aktivacije**		
	metil metansulfonat	66-27-3
	mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokvinolin-N-oksid	56-57-5
	citozin arabinozid	147-94-4
2. **Klastogeni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija**		
	benzo(a)piren	50-32-8
	ciklofosfamid	50-18-0
3. **Anevgeni**		
	kolhicin	64-86-8
	vinblastin	143-67-9

POSTOPEK

Časovni razpored tretiranja

Da bi bila verjetnost odkritja anevgenih ali klastogenih snovi, ki delujejo v določeni fazi celičnega cikla, čim večja, mora biti s preskusno kemikalijo tretirano zadostno število celic v vseh fazah njihovih celičnih ciklov. Vsa tretiranja je treba začeti in končati med eksponentno rastjo celic, celice pa morajo do vzorčenja še naprej rasti. Zato se lahko časovni razpored tretiranja za celične linije in primarne celične kulture nekoliko razlikuje od tistega za limfocite, pri katerih je treba začetek celičnega cikla stimulirati z mitogeni (17). Pri limfocitih je najučinkovitejši pristop ta, da se tretiranje s preskusno kemikalijo začne 44 do 48 ur po stimulaciji s fitohemaglutininom, ko se celice delijo asinhrono (6).

Iz objavljenih podatkov (19) je razvidno, da se anevgeni in klastogeni odkrijejo s kratkotrajnim tretiranjem, ki traja od 3 do 6 ur v prisotnosti S9 ali brez nje, čemur sledi odstranitev preskusne kemikalije in vzorčenje ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (7).

Za temeljito oceno, ki bi bila potrebna za sklep o negativnem rezultatu, je treba izvesti vse tri naslednje preskusne pogoje ter pri tem uporabiti kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje ter dolgotrajno tretiranje brez presnovne aktivacije (glej odstavke 56, 57 in 58):

— celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji brez presnovne aktivacije in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (19),

— celice je treba za 3 do 6 ur izpostaviti preskusni kemikaliji s presnovno aktivacijo in vzorčiti ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja (19),

▼M7

— celice morajo biti kemikaliji nenehno izpostavljene brez presnovne aktivacije, dokler se ne vzorčijo ob času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla.

Če so pri katerem koli od navedenih preskusnih pogojev rezultati pozitivni, morda ni treba raziskovati nobenih drugih režimov tretiranja.

Čas vzorčenja ali obnavljanja se lahko podaljša za nadaljnje 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla (tj. skupno trajanje 3,0 do 4,0 dolžine celičnega cikla po začetku kratkotrajnega ali dolgotrajnega tretiranja), če je znano ali se domneva, da preskusna kemikalija vpliva na dolžino celičnega cikla (npr. pri preskušanju nukleozidnih analogov), zlasti za p53-kompetentnih celic (35) (36) (77). Te možnosti so namenjene primerom, kjer se lahko pojavijo pomisleki glede morebitnih interakcij med preskusno kemikalijo in citohalazinom B. Ko se uporabljajo daljši časi vzorčenja (tj. skupaj 3,0 do 4,0 dolžine celičnega cikla časa gojitve), je treba biti pozoren na to, da se celice še vedno dejavno delijo. Pri limfocitih se lahko na primer eksponentna rast po 96 urah po stimulaciji zmanjšuje in monoslojne celične kulture lahko postanejo konfluentne.

Priporočeni časovni razporedi tretiranja celic so predstavljeni v preglednici 2. Ti splošni časovni razporedi tretiranja se lahko prilagodijo (ob ustrezni utemeljitvi) glede na stabilnost ali reaktivnost preskusne kemikalije ali določene značilnosti rasti uporabljenih celic.

Preglednica 2

Trajanja tretiranja in odvzema celic pri *in vitro* preskusu mikronukleusov

Limfociti, primarne celice in celične linije, tretirane s citohalazinom B	+ S9 kratkotrajno tretiranje	Tretiranje traja od 3 do 6 ur v prisotnosti S9; odstranita se S9 in obdelovalni medij; dodata se svež medij in citohalazin B; celice se odvzamejo ob 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja.
	– S9 kratkotrajno tretiranje	Tretiranje traja od 3 do 6 ur; odstrani se obdelovalni medij; dodata se svež medij in citohalazin B; celice se odvzamejo ob 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla po začetku tretiranja.
	– S9 daljše tretiranje	Tretiranje traja od 1,5 do 2 dolžini normalnega celičnega cikla v prisotnosti citohalazina B; celice se odvzamejo ob koncu obdobja tretiranja.
Celične linije, tretirane brez citohalazina B (enako kot prej navedeni časovni razporedi tretiranja, vendar brez dodajanja citohalazina B)		

Pri monoslojnih kulturah so lahko po zaključku tretiranja, ki traja 3 do 6 ur, prisotne mitotične celice (so okrogle in se ločujejo od površine). Ker se te mitotične celice zlahka ločijo, se lahko ob odstranitvi gojišča s preskusno kemikalijo izgubijo. Če obstaja dokaz o znatnem povečanju števila mitotičnih celic v primerjavi s kontrolami, ki kažejo verjetno mitotično zaviranje, potem je treba celice zbrati s centrifugiranjem in jih dodati nazaj h kulturi, da ne bi izgubili celic, pri katerih poteka mitoza in pri katerih ob odvzemu celic obstaja tveganje nastanka mikronukleusov/kromosomske aberacije.

▼M7

Odvzem celic in priprava preparatov

Vsako kulturo je treba odvzeti in obdelati ločeno. Priprava celic lahko vključuje hipotonično obdelavo, vendar to ni potrebno, če se ustrezno širjenje celic doseže tudi drugače. Za pripravo preparatov se lahko uporabijo različne tehnike, pod pogojem, da se za štetje pridobijo celični preparati visoke kakovosti. Celice z nedotaknjeno celično membrano in citoplazmo je treba ohraniti, da se omogoči odkrivanje mikronukleusov in (v primeru metode citokinetskega bloka) zanesljiva opredelitev celic z dvema jedroma.

Preparati se lahko obarvajo z različnimi metodami, kot so barvila Giemsa ali DNK-specifična fluorescentna barvila. Uporaba ustreznih fluorescentnih barvil (npr. akridin oranž (78) ali Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) lahko prepreči nastanek nekaterih artefaktov, povezanih z uporabo barvila, ki ni DNK-specifično. Antikinetohorna protitelesa, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) s pancentromernimi DNK-sondami ali primarno označevanje *in situ* s pancentromerno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, skupaj z ustreznim nasprotnim barvanjem DNK, se lahko uporabijo za opredelitev vsebine (obarvajo se celi kromosomi, acentrični kromosomski delci pa ne) mikronukleusov, če se pridobivajo mehanistični podatki o njihovem nastanku (16) (17). Za razlikovanje med anevgenimi in klastogenimi snovmi se lahko uporabijo druge metode, če so se izkazale kot učinkovite in so validirane. Na primer pri določenih celičnih linijah se lahko pridobijo koristne informacije z meritvijo jedra sub-2N kot hipodiploidnega dogodka s tehnikami, kot so analiza slik, laserska vrstična citometrija ali pretočna citometrija (80) (81) (82). Znaki morebitne anevploidije se lahko odkrijejo tudi z morfološkimi opazovanji jeder. Poleg tega je lahko uporaben način za določitev tega, ali so mikronukleusi posledica pretrganja kromosoma (pri čemer vemo, da se izguba kromosomov pri preskusu kromosomskih aberacij ne bi odkrila), preskus kromosomskih aberacij v metafazi, najbolje ob uporabi iste vrste celic in protokola s primerljivo občutljivostjo.

Analiza

Vse preparate, vključno s tistimi s kontrolo s topilom, netretiranimi (če se uporabljajo) in pozitivnimi kontrolami, je treba pred mikroskopsko analizo pogostosti mikronukleusov neodvisno označiti. Pri uporabi avtomatiziranega sistema štetja, na primer pretočne citometrije, laserske vrstične citometrije ali analize slike, je treba uporabiti ustrezne tehnike za nadzor kakršnih koli izkrivljanj ali sprememb. Ne glede na to, ali se za štetje mikronukleusov uporablja avtomatizirana platforma, je treba sočasno oceniti proliferacijski indeks citokinetskega bloka, indeks pomnoževanja, relativno podvojitev populacije ali relativno povečanje števila celic.

V kulturah, tretiranih s citohalazinom B, je treba pogostost mikronukleusov analizirati v vsaj 2 000 celicah z dvema jedroma na koncentracijo in kontrolo (83), enakomerno porazdeljenimi med ponovljenimi vzorci, če se ti uporabljajo. V primeru ene same kulture na odmerek (glej odstavek 28) je treba v tej eni kulturi šteti vsaj 2 000 celic z dvema jedroma na kulturo (83). Če je za štetje pri vsaki koncentraciji uporabljenih precej manj kot 1 000 celic z dvema jedroma na kulturo (v primeru dveh ponovitev kulture) ali 2 000 celic (v primeru ene same kulture) in če ni ugotovljeno znatno povečanje števila mikronukleusov, je treba preskus ponoviti z več celicami ali z manj citotoksičnimi koncentracijami, kar je ustrezneje. Paziti je treba, da se ne štejejo celice z dvema jedroma, ki so nepravilnih oblik ali pri katerih se velikost jeder zelo razlikuje. Prav tako se celice z dvema jedroma ne smejo zamenjevati s slabo razširjenimi celicami z več jedri. Celice, ki imajo več kot dve glavni jedri, se ne analizirajo

▼M7

glede mikronukleusov, saj je lahko izhodiščna pogostost mikronukleusov v teh celicah večja (84). Štetje celic z enim jedrom je sprejemljivo, če je za preskusno snov znano, da vpliva na delovanje citohalazina B. V takih primerih je koristen ponovljen preskus brez citohalazina B. Uporabne informacije se lahko pridobijo s tem, da se poleg celic z dvema jedroma štejejo tudi celice z enim jedrom (85) (86), vendar to štetje ni obvezno.

V celičnih linijah, ki se preskušajo brez tretiranja s citohalazinom B, je treba mikronukleuse šteti v vsaj 2 000 celicah z dvema jedroma na koncentracijo in kontrolo (83), enakomerno porazdeljenimi med ponovljenimi vzorci, če se ti uporabljajo. V primeru uporabe ene kulture na koncentracijo (glej odstavek 28) je treba v tej kulturi v štetje vključiti vsaj 2 000 celic na kulturo. Če je za štetje pri vsaki koncentraciji na voljo znatno manj kot 1 000 celic (v primeru dveh ponovitev kulture) ali 2 000 celic (v primeru ene same kulture) in če ni ugotovljeno znatno povečanje števila mikronukleusov, je treba preskus ponoviti z več celicami ali z manj citotoksičnimi koncentracijami, kar je ustrezneje.

Kadar se uporabi citohalazin B, je treba za oceno celične proliferacije določiti proliferacijski indeks citokinetskega bloka ali indeks pomnoževanja (glej Dodatek 2) na podlagi vsaj 500 celic na kulturo. Kadar se tretiranje izvaja v odsotnosti citohalazina B, je treba zagotoviti dokaz, da so se celice v kulturi delile, kot je obravnavano v odstavkih od 24 do 28.

Usposobljenost laboratorija

Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi kemikalijami, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj enega s presnovno aktivacijo in enega brez nje ter enega, ki deluje z anevgenim mehanizmom, pri čemer so kemikalije izbrane izmed kemikalij iz preglednice 1) ter različnimi negativnimi kontrolami (vključno z netretiranimi kulturami in različnimi topili/vehikli), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih od 49 do 52.

Izbor kemikalij za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1) je treba preiskati s kratkotrajnim ali dolgotrajnim tretiranjem brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje klastogenih in anevgenih kemikalij, določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije ter dokaže ustreznost postopkov štetja (mikroskopska vizualna analiza, pretočna citometrija, laserska vrstična citometrija ali analiza slike). Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemijskih snovi, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokaže občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Laboratorij mora določiti:

— območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter

— območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah, če obstajajo. Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (87) (88). Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih poskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati

▼M7

metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (88)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (83). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (tj. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (87).

Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba proučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pojav celic z mikronukleusi iz ene kulture ali vsote ponovitev kulture, kot je opisano v odstavku 28. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (87) (88). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 50), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

Če se uporabi tehnika citokinetskega bloka, se pri ocenjevanju nastajanja mikronukleusov uporabi samo pogostost celic z dvema jedroma z mikronukleusi (ne glede na število mikronukleusov na celico). O štetju števila celic z enim, dvema ali več jedri se lahko poroča ločeno in s takim štetjem se lahko pridobijo uporabne informacije, vendar ni obvezno.

Določiti je treba sočasne meritve citotoksičnosti in/ali citostaze za vse tretirane, pozitivne in negativne kontrolne kulture (16). Pri uporabi metode citokinetskega bloka je treba za vse tretirane in kontrolne kulture izračunati proliferacijski indeks citokinetskega bloka ali indeks pomnoževanja kot merili zakasnitve celičnega cikla. V odsotnosti citohalazina B je treba uporabiti relativno podvojitev populacije ali relativno povečanje števila celic (glej Dodatek 2).

Navedejo se podatki za posamezne kulture. Poleg tega se vsi podatki povzamejo v obliki preglednice.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa temelji na naslednjih merilih:

— Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 50.

— Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 50) morajo povzročiti odzive, ki so skladni z odzivi iz zbirke podatkov laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih poskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.

— Izpolnjena morajo biti merila za celično proliferacijo v kontroli s topilom(odstavki od 25 do 27).

— Preskušeni so bili vsi preskusni pogoji, razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (odstavki od 36 do 40).

— Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavki 28 ter od 44 do 46).

▼M7

— Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih od 24 do 31.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavke od 36 do 39):

— pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo (89),

— je pri vsaj enem poskusnem pogoju povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom (glej odstavek 28),

— je kateri koli od rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi, glej odstavek 52).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči prelome kromosomov in/ali pridobitev ali izgubo v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena tudi v virih (90) (91) (92).

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od proučevanih preskusnih pogojev (glej odstavke od 36 do 39):

— pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— ne pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

— vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 52).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti preloma kromosomov in/ali pridobitve ali izgube v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena tudi v virih (90) (91) (92).

Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, in/ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Štetje dodatnih celic (po potrebi) ali izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo [tj. koncentracija ali izvor S9]).

Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključi, da je odziv dvoumen.

Preskusne kemikalije lahko pri *in vitro* preskusu mikronukleusov povzročijo nastanek mikronukleusov zato, ker povzročajo prelom ali izgubo kromosomov ali pa oboje hkrati. Za ugotovitev, ali je mehanizem za nastajanje mikronukleusov posledica klastogenega in/ali anevgenega delovanja, se lahko izvede nadaljnja analiza z uporabo antikinetohornih protiteles, *in situ* sond, specifičnih za centromere, ali drugih metod.

▼M7

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— reaktivnost preskusne kemikalije s topilom/vehiklom ali gojiščem celic;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/nosilcu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila;

— odstotek topila v končnem gojišču.

Celice:

— vrsta in izvor uporabljenih celic;

— ustreznost uporabljene vrste celic;

— za celične linije – odsotnost mikoplazme;

— za celične linije – informacije o trajanju celičnega cikla, podvojitvenem času ali indeksu proliferacije;

— pri uporabi limfocitov – spol donorjev krvi, starost in vse pomembne informacije o donorju, uporabljeni krvi v celoti ali ločenih limfocitih, mitogenih;

— običajno trajanje celičnega cikla (negativne kontrole);

— za celične linije – število pasaž, če je na voljo;

— za celične linije – metode vzdrževanja celičnih kultur;

— za celične linije – modalno število kromosomov.

▼M7

Preskusni pogoji:

— identiteta snovi za citogenetski blok (npr. cytoB), če je uporabljena, njena koncentracija in trajanje izpostavljenosti celic;

— koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v μg ali mg/ml ali mM gojišča);

— razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno s podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;

— sestava gojišča, koncentracija CO_2, če je na voljo, stopnja vlažnosti;

— koncentracija (in/ali volumen) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;

— inkubacijska temperatura in čas trajanja inkubacije;

— trajanje tretiranja;

— odvzem celic po tretiranju;

— gostota celic ob nasaditvi, če je ustrezno;

— vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali volumen zmesi S9, S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9 (npr. encimska aktivnost, sterilnost, presnovna zmogljivost);

— kemikalije pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije, pogoji in trajanje tretiranja ter obdobja obnavljanja;

— metode priprave preparatov in uporabljene tehnike barvanja;

— merila za štetje celic z mikronukleusi (izbira celic, primernih za analizo, in opredelitev mikronukleusov);

— števila analiziranih celic;

— metode merjenja citotoksičnosti;

— vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;

— uporabljene metode statistične analize;

— metode, kot so uporaba antikinetohornih protiteles ali pancentromerno specifičnih sond, da se ugotovi, ali mikronukleusi vsebujejo cele kromosome ali njihove fragmente, če je ustrezno;

— uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

Rezultati:

— opredelitev celic, sprejemljivih za analizo;

— ob odsotnosti citohalazina B število tretiranih celic in število odvzetih celic za vsako kulturo v primeru celičnih linij;

▼M7

— uporabljena meritev citotoksičnosti, npr. proliferacijski indeks citokinetskega bloka ali indeks pomnoževanja v primeru metode citokinetskega bloka; relativno povečanje števila celic ali relativna podvojitev populacije, če se metode citokinetskega bloka ne uporabljajo; morebitna druga opažanja (npr. konfluentnost celic, apoptoza, nekroza, štetje v metafazi, pogostost celic z dvema jedroma);

— znaki obarjanja in čas odkritja;

— podatki o vrednosti pH in osmolarnosti obdelovalnega gojišča, če sta bili določeni;

— porazdelitev celic z enim, dvema ali več jedri v primeru uporabe metode citokinetskega bloka;

— število celic z mikronukleusi, navedeno ločeno za vsako tretirano in kontrolno kulturo, ter po potrebi opredelitev, ali so iz celic z dvema ali enim jedrom;

— razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

— podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);

— podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, skupaj z razponi, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni ter 95-odstotnimi kontrolnimi mejami za porazdelitev, pa tudi število podatkov;

— statistična analiza; p-vrednosti, če obstajajo.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* zv. 392/1–2, str. 1–4.

(3) Parry, J. M. in Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, zv. 287/1, str. 3–15.

(4) Fenech, M. in Morley, A. A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* zv. 43/172–173, str. 233–246.

(5) Kirsch-Volders, M. idr. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 35/3, str. 167–172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* zv. 2/5, str. 1084–1104.

(7) Fenech, M. in Morley, A. A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* zv. 161/2, str. 193–198.

(8) Eastmond, D. A. in Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* zv. 13/1, str. 34–43.

▼M7

(9) Eastmond, D. A. in Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* zv. 234/5, str. 9–20.

(10) Miller, B. M. idr. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* zv. 6/4, str. 297–302.

(11) Farooqi, Z., Darroudi, F. in Natarajan, A. T. (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* zv. 8/4, str. 329–334.

(12) Migliore, L. idr. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* zv. 319/3, str. 205–213.

(13) Norppa, H., Renzi, L. in Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* zv. 8/6, str. 519–525.

(14) Eastmond, D. A, Rupa, D. S. in Hasegawa, L. S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* zv. 322/1, str. 9–20.

(15) Marshall, R. R. idr. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* zv. 372/2, str. 233–245.

(16) Zijno, P. idr. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* zv. 372/2, str. 211–219.

(17) Kirsch-Volders idr. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* zv. 540/2, str. 153–163.

(18) Poglavje B.10 te priloge*: In vitro* preskus kromosomskih aberacij pri sesalcih.

(19) Lorge, E. idr. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* zv. 607/1, str. 13–36.

(20) Clare, G. idr. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* zv. 607/1, str. 37–60.

(21) Aardema, M. J. idr. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* zv. 607/1, str. 61–87.

(22) Wakata, A. idr. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* zv. 607/1, str. 88–124.

(23) Oliver, J. idr. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* zv. 607/1, str. 125–152.

(24) Albertini, S. idr. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* zv. 392/1–2, str. 187–208.

(25) Miller, B. idr. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* zv. 392/1–2, str. 45–59.

▼M7

(26) Miller, B. idr. (1998). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* zv. 410, str. 81–116.

(27) Kalweit, S. idr. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* zv. 439/2, str. 183–190.

(28) Kersten, B. idr. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* zv. 445/1, str. 55–71.

(29) von der Hude, W. idr. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, zv. 468/2, str. 137–163.

(30) Garriott, M. L., Phelps J. B.in Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* zv. 517/1–2, str. 123–134.

(31) Matsushima, T. idr. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* zv. 14/6, str. 569–580.

(32) Elhajouji, A. in Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* zv. 607/1, str. 1–152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, zv. 702/2, str. 139–147.

(34) Hashimoto, K. idr. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, zv. 59/1, str. 28–36.

(35) Honma, M. in Hayashi, M. (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 52/5, str. 373–384.

(36) Zhang, L. S. idr. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* zv. 347/3–4, str. 105–115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25. sestanek odbora ESAC, 16.–17. novembra 2006. Na voljo na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Na voljo na: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. idr. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* zv. 23/4, str. 271–283.

(40) ILSI paper (osnutek). Lorge, E., Moore, M. M., Clements, J., O'Donovan, M., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Sutter, A., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M. in Young-Tannir, J. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. idr. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* zv. 257/2, str. 147–205.

(42) Morita, T. idr. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* zv. 268/2, str. 297–305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, zv. 8/6, str. 789–886.

(44) Long, L. H. idr. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* zv. 634/1–2, str. 177–183.

(45) Nesslany, F. idr. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, zv. 49, str. 439–452.

(46) Fenech, M. in Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* zv. 147/1–2, str. 29–36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* zv. 392, str. 11–18.

(48) Payne, C. M. idr. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, zv. 62/6, str. 825–840.

(49) Bazin, E. idr. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 51/3, str. 251–259.

(50) Le Hegarat, L. idr. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, zv. 25/6, str. 555–560.

(51) Josse, R. idr. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, zv. 27/3, str. 295–304.

(52) Kalweit, S. idr. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* zv. 17/3, str. 257–260.

(53) Knasmüller, S. idr. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* zv. 198/1–3, str. 315–328.

(54) Gibson, D. P. idr. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* zv. 392/1–2, str. 61–70.

(55) Bonassi, S. idr. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* zv. **37/1**, str. 31–45.

(56) Maron, D. M. in Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* zv. 113/3–4, str. 173–215.

(57) Ong, T.-m. idr. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* zv. 4/1, str. 55–65.

▼M7

(58) Elliott, B. M. idr. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* zv. 7, str. 175–177.

(59) Matsushima, T. idr. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, v *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F. J. idr. (eds.), Elsevier, North-Holland, str 85–88.

(60) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. in Galloway, S. M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* zv. 28, str. 51–59.

(61) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP). Na voljo na: http://www.pops.int/.

(62) Tucker, J. D. in Christensen, M. L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, zv. 190/3, str. 225–8.

(63) Krahn, D. F., Barsky F. C. in McCooey, K. T. (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R. R., Costa, D. L. in Schaich, K. M. (eds.), Plenum, New York, str. 91–103.

(64) Zamora, P. O. idr. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, zv. 5/6, str. 795–801.

(65) Asakura, M. idr. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, zv. 652/2, str. 122–130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* zv. 285/1, str. 35–44.

(67) Phelps, J. B., Garriott, M. L. in Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* zv. 521/1–2, str. 103–112.

(68) Kirsch-Volders, M. idr. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research,* zv. 564, str. 97–100.

(69) Lorge, E. idr. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* zv. 655/1–2, str. 1–3.

(70) Surralles, J. idr. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* zv. 341/3, str. 169–184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, zv. 724, str. 86–87.

(72) Pfuhler, S. idr. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, zv. 723/2, str. 101–107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Na voljo na zahtevo.

▼M7

(74) Morita, T., Honma, M. in Morikawa, K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, zv. 741, str. 32–56.

(75) Brookmire, L. Chen, J. J. in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 54/1, str. 36–43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. idr. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research,* zv. 746/1, str. 29–34.

(78) Hayashi, M., Sofuni, T. in Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* zv. 120/4, str. 241–247.

(79) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. in Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* zv. 120/4, str. 269–275.

(80) Bryce, S. M. idr. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 52/4, str. 280–286.

(81) Nicolette, J. idr. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 52/5, str. 355–362.

(82) Shi, J., Bezabhie, R. in Szkudlinska, A. (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, zv. 25/1, str. 33–40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, št. 198, OECD Publishing, Pariz.

(84) Fenech, M. idr. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* zv. 534/1–2, str. 65–75.

(85) Elhajouji, A., Cunha, M. in Kirsch-Volders, M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, zv. 13/2, str. 193–8.

(86) Kirsch-Volders, M. idr. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* zv. 85/8, str. 873–99.

(87) Hayashi, M. idr. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 723/2, str. 87–90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. druga izdaja, John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W. P., Garriott, M. L. in Lee, C. (2003). „*In vitro* micronucleus test“, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, druga izdaja, Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, str. 463–467.

(90) Fleiss, J. L., Levin, B. in Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, tretja izdaja, John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S. M. idr. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 10/dod. 10, str. 1–175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. idr. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Anevgen: vsaka kemikalija ali proces, na podlagi katerega pride do anevploidije v celicah ali organizmih zaradi reagiranja z elementi mitotskega in mejoznega cikla delitve celic.

Anevplodija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Apoptoza: programirana celična smrt, za katero je značilna vrsta korakov, ki vodijo v razgradnjo celic na delce, obdane z membrano, ki se nato odstranijo s fagocitozo ali osipanjem.

Celična proliferacija: povečanje števila celic kot posledica mitotične delitve celic.

Centromera: območje kromosoma, ki vsebuje DNK, kjer sta spojeni obe kromatidi in na katerem sta na obeh straneh pritrjeni obe kinetohori.

Kemikalija: snov ali zmes.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali evkariotskih organizmih.

Citokineza: proces delitve celic, ki nastopi takoj po mitozi in vpliva na oblikovanje dveh hčerinskih celic, ki imata vsaka eno samo jedro.

Proliferacijski indeks citokinetskega bloka (Cytokinesis-Block Proliferation index – CPBI): delež celic, pri katerih se je izvedla druga delitev, v tretirani populaciji glede na netretirano kontrolo (glej Dodatek 2 za formulo).

Citostaza: zaviranje rasti celic (glej Dodatek 2 za formulo).

Citotoksičnost: Za poskuse, zajete v to preskusno metodo in izvedene v prisotnosti citohalazina B, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje proliferacijskega indeksa citokinetskega bloka (CBPI) ali indeksa pomnoževanja pri tretiranih celicah v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavek 26 in Dodatek 2).

Za poskuse, zajete v to preskusno metodo in izvedene brez citohalazina B, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne podvojitve populacije (RPD) ali relativnega povečanja števila celic (RICC) pri tretiranih celicah v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavek 27 in Dodatek 2).

Genotoksiče: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami genov, kromosomskimi aberacijami in anevploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajno poškodbo kromosomov.

Celice v interfazi: celice, ki niso v fazi mitoze.

Kinetohor: beljakovinska struktura, ki nastane na centromeri kromosoma, na katero se med delitvijo celice pripnejo niti delitvenega vretena, kar omogoča pravilno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

▼M7

Mikronukleusi: majhna jedra, poleg glavnega jedra celic in ločena od njega, ki nastanejo med telofazo mitoze ali mejoze iz zaostalih fragmentov kromosomov ali celih kromosomov.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mitotični indeks: razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje celične proliferacije te populacije.

Mutagen: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukturi kromosomov (kromosomske aberacije).

Nerazdvajanje: par kromatid se ne razdvoji in ustrezno loči v razvijajoče se hčerinske celice, zaradi česar imata hčerinski celici nenormalno število kromosomov.

Status beljakovine p53: beljakovina p53 je vključena v reguliranje celičnega cikla, apoptozo in popravljanje DNK. Celice brez funkcionalne beljakovine p53, ki ne morejo zaustaviti celičnega cikla ali odstraniti poškodovanih celic z apoptozo ali drugimi mehanizmi (npr. indukcijo popravljanja DNK), povezanimi s funkcijami beljakovine p53, s katerimi se ta odzove na poškodbo DNK, so teoretično bolj nagnjene h genskim mutacijam ali kromosomskim aberacijam.

Poliploidija: numerične kromosomske aberacije v celicah ali organizmih, ki ne vplivajo na posamezen kromosom ali kromosome (anevploidija), temveč na celoten set kromosomov.

Proliferacijski indeks: metoda merjenja citotoksičnosti, ko se citohalazin B ne doda (glej Dodatek 2 za formulo).

Relativno povečanje števila celic (RICC): metoda merjenja citotoksičnosti, ko se citohalazin B ne doda (glej Dodatek 2 za formulo).

Relativna podvojitev populacije (RPD): metoda merjenja citotoksičnosti, ko se citohalazin B ne doda (glej Dodatek 2 za formulo).

Indeks pomnoževanja (RI): razmerje ciklov celične delitve v tretirani kulturi glede na netretirano kulturo med obdobjem izpostavljenosti in obnavljanja (glej Dodatek 2 za formulo).

Frakcija S9, pripravljena iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirana kontrola: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

▼M7

Dodatek 2

FORMULE ZA OCENJEVANJE CITOTOKSIČNOSTI

Ko se doda citohalazin B, ocena citotoksičnosti temelji na **proliferacijskem indeksu citokinetskega bloka (CBPI)** ali **indeksu pomnoževanja (RI)** (17) (69). CBPI označuje srednje število jeder na celico in se lahko uporabi za izračun celične proliferacije. RI označuje relativno število celičnih ciklov na celico med obdobjem izpostavljenosti citohalazinu B v tretiranih kulturah v primerjavi s kontrolnimi kulturami in se lahko uporabi za izračun % citostaze:

$$\% \text{ citostaze} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

in

T = kultura, tretirana s preskusno kemikalijo

C = kontrolna kultura

pri čemer je:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{št.celic z enim jedrom}) + (2 \times \text{št.celic z dvema jedroma}) + (3 \times \text{št.celic z več jedri}))}{(\text{skupno število celic})}$$

Tako je CPBI z vrednostjo 1 (vse celice imajo eno jedro) enak 100-odstotni citostazi.

Citostaza = 100 − RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{št.celic z dvema jedroma}) + (2 \times \text{št.celic z več jedri}))/(\text{skupno število celic})_T}{((\text{št.celic z dvema jedroma}) + (2 \times \text{št.celic z več jedri}))/(\text{skupno število celic})_C} \times 100$$

T = tretirane kulture

C = kontrolne kulture

RI v višini 53 % torej pomeni, da se je v primerjavi s številom celic, ki so se delile v kontrolni kulturi in oblikovale celice z dvema jedroma in več jedri, v tretirani kulturi delilo le 53 % tega števila celic, kar pomeni, da je citostaza 47-odstotna.

Ko se citohalazin B ne doda, se priporoča ocena citotoksičnosti na podlagi **relativnega povečanja števila celic (RICC)** ali **relativne podvojitve populacije (RPD)** (69), saj se pri obeh metodah upošteva delež celične populacije, ki se je delil.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{povečanje števila celic v tretiranih kulturah}(\text{končno} - \text{začetno}))}{(\text{povečanje števila celic v kontrolnih kulturah}(\text{končno} - \text{začetno}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{št.podvojitev populacije v tretiranih kulturah})}{(\text{št.podvojitev populacije v kontrolnih kulturah})} \times 100$$

pri čemer je:

podvojitev populacije = [log (število celic po tretiranju ÷ prvotno število celic)] ÷ log 2

RICC ali RPD v višini 53 % torej pomeni, da je citotoksičnost/citostaza 47-odstotna.

▼M7

S **proliferacijskim indeksom (PI)** se lahko citotoksičnost oceni s štetjem števila klonov, ki imajo eno celico (cl1), dve celici (cl2), tri do štiri celice (cl4) ter pet do osem celic (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI se uporablja kot dragocen in zanesljiv parameter citotoksičnosti tudi za celične linije, gojene *in vitro* v odsotnosti citohalazina B (35) (36) (37) (38), ter se lahko šteje za uporaben dodaten parameter.

V vsakem primeru mora biti število celic pred tretiranjem v tretiranih in negativnih kontrolnih kulturah enako.

Čeprav se je v preteklosti kot parameter citotoksičnosti uporabljalo relativno število celic (RCC) (tj. število celic v tretiranih kulturah/število celic v kontrolnih kulturah), to ni več priporočljivo, saj lahko podceni vrednost citotoksičnosti.

Če se uporablja avtomatiziran sistem štetja, na primer pretočna citometrija, laserska vrstična citometrija ali analiza slike, se lahko število celic v formuli zamenja s številom jeder.

V negativnih kontrolnih kulturah mora biti podvojitev populacije ali indeks pomnoževanja združljiv z zahtevo po vzorčenju celic po tretiranju v času, ki ustreza približno 1,5 do 2,0 dolžine normalnega celičnega cikla.

▼M3

B.50. **PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK: DA**

UVOD

1. Smernice OECD za preskušanje kemikalij in preskusne metode EU se redno preverjajo zaradi znanstvenega napredka, spreminjajočih se zakonodajnih potreb in vprašanj, povezanih z dobrim počutjem živali. Prva preskusna metoda (B.42) za določanje preobčutljivosti kože pri miši, lokalna analiza bezgavk (LLNA; Smernica za preskušanje OECD 429) je bila že preverjena (1). Objavljene so podrobnosti o validaciji LLNA in pregled s tem povezanega dela (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA se za merjenje množenja limfocitov uporablja radioizotopni timidin ali jod, zato je lahko uporaba analize omejena v primerih, kjer je pridobitev, uporaba ali odstranitev radioaktivnosti težavna. LLNA, DA (razvil jo je Daicel Chemical Industries, Ltd) je neradioaktivna različica LLNA, ki količinsko opredeljuje vsebnost adenozin-trifosfata (ATP) s pomočjo bioluminescence kot pokazatelja množenja limfocitov. Preskusno metodo LNNA: DA je validirala in pregledala mednarodna strokovna skupina za ocenjevanje ter jo priporočila kot koristno za opredelitev kemikalij, ki povzročajo preobčutljivost, in kemikalij, ki je ne povzročajo, z nekaterimi omejitvami (10) (11) (12) (13). Ta preskusna metoda je zasnovana za ocenjevanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami (snovmi in zmesmi) pri živalih. Poglavje B.6 te priloge in Smernica za preskušanje OECD 406 uporabljata preskuse na morskih prašičkih, predvsem maksimizacijski in Buehlerjev preskus na morskih prašičkih (14). LLNA (poglavje B.42 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 429) in dve spremembi, pri katerih se radioaktivnost ne uporablja, analiza LLNA: DA (poglavje B.50 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 A) in LLNA: BrdU-ELISA (poglavje B.51 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 B) zaradi manj pogoste in izpopolnjene uporabe živali zagotavljajo prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih iz metode B.6 in Smernica za preskušanje OECD 406 (14).

2. Podobno kot LLNA tudi LLNA: DA preučuje indukcijsko fazo preobčutljivosti kože in zagotavlja količinske podatke, ki so primerni za oceno odziva na odmerek. Ker odkriva povzročitelje preobčutljivosti, ne da bi bilo pri tem treba uporabiti radioaktivni označevalec za DNA, se ne pojavljajo vprašanja glede poklicne izpostavljenosti radioaktivnosti in odstranjevanja odpadkov. Zaradi tega bo za odkrivanje povzročiteljev preobčutljivosti morda mogoča pogostejša uporaba miši, zaradi česar bi se lahko še bolj zmanjšala uporaba morskih prašičkov za preskušanje morebitne preobčutljivosti kože (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (14).

OPREDELITVE POJMOV

3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

4. Analiza LLNA: DA je spremenjena metoda LLNA za ugotavljanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami, s posebnimi omejitvami. Ni nujno, da to pomeni, da je treba v vseh primerih namesto preskusov na morskih prašičkih in LLNA (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (14), uporabiti analizo LLNA: DA, temveč da je ta analiza enakovredna in se lahko uporabi kot druga možnost, pri kateri običajno niso več potrebne dodatne potrditve pozitivnih in negativnih rezultatov (10) (11). Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom opravljanja študije upoštevati vse razpoložljive informacije o preskusni snovi. Takšne informacije bodo

▼M3

vključevale vrsto in kemijsko sestavo preskusne snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na preskusni snovi, *in vitro* ali *in vivo*; in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. Te informacije je treba upoštevati, da se določi, ali je metoda LLNA: DA primerna za preskusno snov (glede na nezdružljivost omejenega števila vrst kemikalij z analizo LLNA: DA [glej odstavek 5] in za lažjo izbiro odmerka.

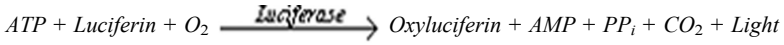
5. Analiza LLNA: DA je metoda *in vivo* in posledično ne odpravlja uporabe živali pri ocenjevanju delovanj, ki povzročajo alergijsko preobčutljivost ob stiku. Vendar ima možnost, da v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih (B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (14) zmanjša število živali, potrebnih v ta namen. Poleg tega nudi analiza LLNA: DA znatno izboljšanje (manj bolečine in trpljenja) načina, kako se živali uporabljajo za preskušanje alergijske preobčutljivosti ob stiku, saj v nasprotju z metodo B.6 in Smernico za preskušanje 406 ne zahteva, da se povzročijo izzvane reakcije prekomerne občutljivosti kože. Kljub prednostim analize LLNA: DA v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 (14), obstajajo nekatere omejitve, zaradi katerih je lahko nujna uporaba metode B.6 ali Smernice za preskušanje OECD 406 (npr. preskušanje določenih kovin, lažni pozitivni rezultati pri nekaterih dražilnih snoveh za kožo [kot so nekatere vrste površinsko razgradljivih kemikalij] (6) (1 in poglavje B.42 te priloge), topnost preskusne snovi). Poleg tega je zaradi kemijskih razredov ali snovi s funkcionalnimi skupinami, za katere se je izkazalo, da lahko delujejo kot moteči dejavniki (16), lahko potrebna uporaba preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406 (14)). Za omejitve, določene za LLNA (1 in poglavje B.42 te priloge), je bilo priporočeno, da se uporabljajo tudi za analizo LLNA: DA (10). Poleg tega uporaba analize LLNA: DA morda ni primerna za uporabo snovi, ki vplivajo na ravni adenozin-trifosfata (ATP) (npr. snovi, ki delujejo kot inhibitorji ATP), ali snovi, ki vplivajo na natančno merjenje ATP v celicah (npr. prisotnost encimov, ki razgrajujejo ATP, prisotnost zunajcelične ATP v bezgavki). Razen takšnih določenih omejitev bi morala biti analiza LLNA: DA primerna za preskušanje katere koli snovi, razen če so s temi snovmi povezane lastnosti, ki lahko ovirajo natančnost analize LLNA: DA. Poleg tega je treba razmisliti o možnosti mejnih pozitivnih rezultatov v primerih, ko so dobljene vrednosti stimulacijskega indeksa (SI) med 1,8 in 2,5 (glej odstavke 31–32). To temelji na podatkovni zbirki za validacijo s 44 snovmi s stimulacijskim indeksom ≥ 1,8 (glej odstavek 6), pri kateri je analiza LLNA: DA pravilno opredelila vseh 32 povzročiteljev preobčutljivosti pri LLNA, vendar je nepravilno opredelila tri od 12 snovi, ki pri LLNA ne povzročajo preobčutljivosti z vrednostmi stimulacijskega indeksa med 1,8 in 2,5 (tj. mejno pozitivna vrednost) (10). Ker pa je bil za določanje vrednosti stimulacijskega indeksa in izračun predvidljivih lastnosti preskusa uporabljen isti nabor podatkov, so lahko navedeni rezultati pretirana ocena dejanskih predvidljivih lastnosti.

NAČELA METODE PRESKUŠANJA

6. Osnovno načelo, na katerem temelji analiza LLNA: DA, je, da povzročitelji preobčutljivosti povzročijo množenje limfocitov v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi. To množenje je sorazmerno z odmerkom in močjo uporabljenega alergena in je preprosto sredstvo za doseganje količinske izmere preobčutljivosti. Množenje se izmeri s primerjavo povprečnega množenja v vsaki preskusni skupini in povprečnega množenja v kontrolni skupini, tretirani z nosilcem. Določi se razmerje med povprečnim množenjem v vsaki tretirani skupini in povprečnim množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem, ki se imenuje stimulacijski indeks (SI) in mora biti ≥ 1,8, preden je nadaljnje ocenjevanje preskusne snovi kot možnega povzročitelja preobčutljivosti kože utemeljeno. Opisani postopki temeljijo na merjenju vsebnosti ATP z bioluminiscenco (za katero je znano,

▼M3

da se ujema s številom živih celic) (17), ki pokaže povečano število množečih se celic v ušesnih bezgavkah (18) (19). Metoda z bioluminiscenco izkorišča encim luciferaze za kataliziranje nastanka svetlobe iz ATP in luciferin v skladu z naslednjo reakcijo:



Oddana osvetljenost je linearno povezana s koncentracijo ATP in se meri z luminometrom. Analiza reakcije med luciferinom in luciferazo je občutljiva metoda za količinsko opredelitev ATP, ki se uporablja na številne načine (20).

OPIS ANALIZE

Izbira živalskih vrst

7. Izbrana vrsta za ta preskus je miš. Validacijske študije za analizo LLNA: DA so bile izvedene samo s sevom CBA/J, ki je zato priporočeni sev (12) (13). Uporabijo se mlade odrasle mišje samice, ki še niso kotile in niso breje. Na začetku študije morajo biti živali stare 8–12 tednov, odstopanje mase živali pa mora biti čim manjše in ne sme presegati 20 % povprečne mase. Namesto tega se lahko uporabi druge seve in samce, ko je dobljenih dovolj podatkov za prikaz, da ne obstajajo značilne razlike v odzivu pri analizi LLNA: DA glede na sev in/ali spol.

Bivalni in prehranjevalni pogoji

8. Miši morajo biti skupinsko nastanjene (21), razen če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev za njihovo ločeno nastanitev. Temperatura v prostoru za poskusne živali mora biti 22 ± 3 °C. Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, razen med čiščenjem prostora, 50 do 60 %. Osvetlitev naj bo umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Priprava živali

9. Živali se naključno izberejo, označijo tako, da je omogočeno posamično prepoznavanje (vendar ne s katero od oblik ušesnih oznak), in zadržijo v kletkah najmanj pet dni pred začetkom dajanja odmerka, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram. Pred začetkom tretiranja se vse živali pregledajo, da se zagotovi, da nimajo opaznih kožnih lezij.

Priprava preskusnih raztopin

10. Trdne kemikalije se pred nanosom na uho miši raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko nanesejo nerazredčene ali pa se razredčijo pred dajanjem odmerka. Pri netopnih kemikalijah, kot so tiste, ki se običajno uporabljajo v medicinskih pripomočkih, je treba uporabiti močno povečano ekstrakcijo v ustreznem topilu, da se odkrije vse ekstraktibilne sestavine za preskušanje pred nanosom na uho miši. Preskusne snovi je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

▼M3

Preverjanje zanesljivosti

11. Za prikaz ustrezne učinkovitosti analize se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki se odzovejo z ustrezno in ponovljivo občutljivostjo kot preskusna snov, ki povzroča preobčutljivost, za katero je stopnja reakcije natančno opredeljena. Uporaba primerjalne pozitivne kontrole je priporočena, saj pokaže zmožnost laboratorija, da uspešno izvede vsako analizo, ter omogoča ocenjevanje ponovljivosti in primerljivosti v enem ali več laboratorijih. Tudi nekateri regulativni organi zahtevajo uporabo pozitivne kontrole pri vsaki raziskavi, zato se uporabnikom priporoča, da se pred izvedbo analize LLNA: DA posvetujejo s pristojnimi organi. V skladu s tem se priporoča redna uporaba primerjalne pozitivne kontrole, saj tako ni potrebno dodatno preskušanje na živalih za izpolnitev zahtev, ki se lahko pojavijo zaradi uporabe redne pozitivne kontrole (glej odstavek 12). Pozitivna kontrola mora povzročiti pozitiven odziv analize LLNA: DA na raven izpostavljenosti, za katero se pričakuje, da bo dala večji stimulacijski indeks (SI) > 1,8 kot negativna kontrolna skupina. Odmerek pozitivne kontrole je treba izbrati tako, da ne povzroči čezmernega draženja kože ali sistemske toksičnosti in da je indukcija ponovljiva, vendar ne čezmerna (tj. SI > 10 bi se štel za čezmernega) Priporočena pozitivna kontrola je 25-odstotni heksil cimetov aldehid (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov [CAS] št. 101-86-0) in 25-odstotni evgenol (št. CAS 97-53-0) v acetonu: olivnem olju (4:1, v/v). V nekaterih okoliščinah se lahko ob ustrezni utemeljitvi uporabijo druge pozitivne kontrole, ki izpolnjujejo zgornja merila.

12. Običajno je uporaba pozitivne kontrolne skupine priporočena, lahko pa obstajajo okoliščine, v katerih redno preskušanje (tj. v razmikih ≤ 6 mesecev) pozitivne kontrole morda zadošča za laboratorije, ki redno izvajajo analizo LLNA: DA (tj. izvajajo analizo LLNA: DA vsaj enkrat mesečno) in imajo vzpostavljeno zbirko podatkov o preteklih pozitivnih kontrolah, ki dokazujejo zmožnost laboratorija, da pridobi ponovljive in natančne rezultate s pozitivnimi kontrolami. Ustrezna strokovnost pri izvajanju analize LLNA: DA se lahko uspešno dokaže z dobivanjem doslednih pozitivnih rezultatov s pozitivno kontrolo pri vsaj desetih neodvisnih preskusih, izvedenih v razumnem časovnem obdobju (tj. v manj kot enem letu).

13. Primerjalno pozitivno kontrolno skupino je treba vključiti vedno, kadar pride do postopkovne spremembe pri analizi LLNA: DA (tj. zamenjava usposobljenega osebja, zamenjava materiala za preskusno metodo in/ali reagentov, zamenjava opreme za preskusno metodo, zamenjava vira preskusnih živali), takšne spremembe pa je treba vedno zabeležiti v laboratorijskih poročilih. Pri odločanju o nujnosti vzpostavitve nove zbirke preteklih podatkov za beleženje doslednosti pri rezultatih pozitivne kontrole je treba upoštevati učinek, ki ga imajo te spremembe na ustreznost predhodno vzpostavljene zbirke preteklih podatkov.

14. Raziskovalci se morajo zavedati, da odločitev o izvajanju redne namesto primerjalne pozitivne kontrolne študije vpliva na ustreznost in sprejemljivost negativnih rezultatov študije, pridobljenih brez primerjalne pozitivne kontrole v razmiku med rednimi pozitivnimi kontrolnimi študijami. Na primer, če je rezultat, pridobljen z redno pozitivno kontrolno študijo, lažno negativen, so lahko vprašljivi negativni rezultati preskusne snovi, pridobljeni v času med zadnjo sprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo in nesprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo. Pri odločanju, ali vključiti primerjalne pozitivne kontrole ali izvajati samo redne pozitivne kontrole, je treba skrbno preučiti posledice teh rezultatov. Treba je razmisliti tudi o uporabi manjšega števila živali v primerjalni pozitivni kontrolni skupini, če je to znanstveno utemeljeno in če laboratorij na podlagi preteklih podatkov, značilnih za laboratorij, dokaže, da se lahko uporabi manjše število miši (22).

▼M3

15. Čeprav je treba pozitivno kontrolo preskusiti v nosilcu, za katerega je znano, da povzroča dosleden odziv (npr. aceton: olivno olje; 4:1, v/v), lahko obstajo nekatere zakonodajne okoliščine, ko je potrebno tudi preskušanje v nestandardnem nosilcu (klinično/kemično ustrezne sestave) (23). Če se primerjalna pozitivna kontrola preskuša v drugem nosilcu kot preskusna snov, je treba za primerjalno pozitivno kontrolo vključiti ločen kontrolni nosilec.

16. V primerih, kjer se ocenjujejo snovi za poseben kemijski razred ali razpon reakcij, so lahko primerjalne snovi uporabne tudi za dokaz, da preskusna metoda deluje pravilno za odkrivanje morebitne preobčutljivosti kože pri teh vrstah snovi. Ustrezne primerjalne snovi morajo imeti naslednje lastnosti:

— strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskusne snovi, ki se preskuša,

— znane fizikalno-kemijske lastnosti;

— podporne podatke iz analiz LLNA: DA;

— podporne podatke od drugih živalskih modelov in/ali ljudi.

PRESKUSNI POSTOPEK

Število živali in velikost odmerkov

17. Na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali z najmanj tremi koncentracijami preskusne snovi, poleg tega pa še primerjalna negativna kontrolna skupina, tretirana zgolj z nosilcem za preskusno snov, in pozitivna kontrola (primerjalna ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15). Treba je razmisliti o preskušanju več odmerkov pozitivne kontrole, zlasti če se pozitivna kontrola preskuša občasno. Živali v kontrolnih skupinah je treba, razen če se ne tretirajo s preskusno snovjo, obravnavati in tretirati na enak način kot živali v tretiranih skupinah.

18. Izbira odmerka in nosilca mora temeljiti na priporočilih iz sklicev (2) in (24). Zaporedni odmerki se običajno izberejo iz ustrezne serije koncentracij, kot so 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Izbira uporabljene serije koncentracij mora biti ustrezno znanstveno utemeljena. Kadar so na voljo, je treba pri izbiri treh zaporednih koncentracij upoštevati vse obstoječe toksikološke informacije (npr. akutno toksičnost in draženje kože) ter strukturne in fizikalno-kemijske informacije o želeni preskusni snovi (in/ali strukturno povezani snovi), tako da je pri največji koncentraciji izpostavljenost največja, hkrati pa ni sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (24) (25). Če takšne informacije niso na voljo, je morda najprej potreben predhodni presejalni preskus (glej odstavke 21–24).

19. Nosilec ne sme ovirati rezultatov preskusa ali vplivati nanje, izbere pa se na podlagi povečevanja topnosti, da se med pripravljanjem raztopine/suspenzije, ki je primerna za uporabo preskusne snov, pridobi največjo možno koncentracijo. Priporočljivi nosilci so aceton: olivno olje (4:1, v/v), N,N-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol in dimetil sulfoksid (6), vendar se lahko uporabljajo tudi drugi, če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev. V nekaterih okoliščinah je morda treba kot dodatno kontrolo uporabiti klinično ustrezno topilo ali trgovsko sestavo, v kateri se trži preskusna snov. Paziti je treba zlasti, da so v nosilni sistem vključene hidrofilne snovi, ki vlažijo kožo in se ne izsušijo takoj, z vključitvijo ustreznih pospeševalcev raztapljanja (npr. 1-odstotnim Pluronic® L92). Zato se je treba izogibati povsem vodenim nosilcem.

▼M3

20. Obdelava bezgavk posamezne miši omogoča oceno spremenljivosti med posameznimi živalmi ter statistično primerjavo razlik med meritvami preskusne snovi in primerjalne kontrolne skupine z nosilcem (glej odstavek 33). Poleg tega je ocena možnosti zmanjšanja števila miši v pozitivni kontrolni skupini izvedljiva samo, če se zbirajo podatki o posameznih živalih (22). Poleg tega nekateri regulativni organi zahtevajo zbiranje podatkov o posameznih živalih. Redno zbiranje podatkov o posameznih živalih zagotavlja prednosti glede dobrega počutja živali, saj se s tem prepreči dvojno preskušanje, ki bi bilo potrebno, če bi bilo treba rezultate, prvotno zbrane na en način (npr. preko združenih podatkov o živalih) zaradi drugih zahtev regulativnih organov (npr. glede podatkov o posameznih živalih) kasneje ponovno preučiti.

Predhodni presejalni preskus

21. Če informacije za določitev največjega odmerka za preskušanje niso na voljo (glej odstavek 18), je treba izvesti predhodni presejalni preskus, da se določi ustrezna velikost odmerka za preskušanje z analizo LLNA: DA. Namen predhodnega presejalnega preskusa je zagotoviti smernice za izbiro največje velikosti odmerka za uporabo v glavni študiji analize LLNA: DA v primerih, ko ni na voljo informacij o koncentraciji, ki povzroči sistemsko toksičnost (glej odstavek 24) in/ali čezmerno draženje kože (glej odstavek 23). Največja velikost odmerka je 100-odstotna preskusna snov za tekočine ali najvišja možna koncentracija za trdne snovi ali suspenzije.

22. Predhodni presejalni preskus se izvede v pogojih, ki so enaki tistim v glavni študiji analize LLNA: DA, s to razliko, da se ne izvede ocena množenja v bezgavkah in da se lahko uporabi manj živali na skupino odmerka. Predlaga se uporaba ene ali dveh živali na skupino odmerka. Vse miši se opazuje dnevno glede kliničnih znakov sistemske toksičnosti ali lokalnega draženja na mestu nanosa. Telesna masa se zabeleži pred preskusom in pred usmrtitvijo (8. dan). Obe ušesi vsake miši se opazuje glede rdečine in oceni s pomočjo preglednice 1 (25). Meritve debeline ušesa se izvedejo z napravo za merjenje debeline (npr. digitalnim mikrometrom ali merilnikom debeline s številčnico) 1. dan (pred odmerkom), 3. dan (približno 48 ur pred prvim odmerkom), 7. dan (24 ur pred usmrtitvijo) in 8. dan. Poleg tega se lahko 8. dan debelino ušesa določi s preluknjanjem ušes za določitev mase, ki se izvede po humani usmrtitvi živali. Znak za čezmerno draženje je rdečina z oceno $\geq$ 3 in/ali povečana debelina ušesa za $\geq$ 25 % na kateri koli dan merjenja (26) in (27). Največji odmerek, izbran za glavno študijo analize LLNA: DA, je naslednji nižji odmerek v seriji koncentracij iz predhodnega presejalnega preskusa (glej odstavek 18), ki ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože.

Preglednica 1

Ocena rdečine

Ugotovitev	Ocena
Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2

▼M3

Ugotovitev	Ocena
Zmerna do močna rdečina	3
Močna rdečina (rdečina rdeče pese) in nastanek krast ovirata razvrstitev rdečine	4

23. Poleg 25-odstotnega povečanja debeline ušesa (26) (27), se za opredelitev dražilnih snovi pri LLNA uporablja tudi statistično značilno povečanje debeline ušesa tretirane miši v primerjavi s kontrolno mišjo tako uporablja za opredelitev dražilnih snovi pri lokalni analizi bezgavk (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Ker pa se lahko statistično značilno povečanje pojavi tudi pri debelini ušesa, manjši od 25 %, ni izrecno povezano s čezmernim draženjem (30) (31) (32) (33) (34).

24. Naslednje klinične ugotovitve lahko nakazujejo sistemsko toksičnost (35), kadar se uporabljajo kot del celovite ocene, in zato lahko pokažejo največjo velikost odmerka za uporabo v glavni analizi LLNA: DA: spremembe v delovanju živčnega sistema (npr. piloerekcija, ataksija, tremorji in krči); vedenjske spremembe (npr. agresivnost, spremembe glede nege, opazna sprememba ravni dejavnosti); spremembe dihanja (npr. spremembe frekvence in intenzivnosti dihanja kot so dispneja, zasoplost in hropenje) ter spremembe glede uživanja hrane in vode. Poleg tega je treba pri oceni upoštevati znake letargije in/ali neodzivnosti ter morebitne klinične znake bolečine in trpljenja, ki niso samo blagi ali trenutni, ali zmanjšanje telesne mase za > 5 % od 1. do 8. dne ter smrtnost. Umirajoče živali ali živali, ki kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtijo na human način (36).

Načrt za poskus glavne študije

25. Načrt za poskus analize je naslednji:

— *1. dan:* Posamično ugotovljena in zabeležena masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Nanos 1-odstotne vodne raztopine natrijevega laurel sulfata (SLS) na vsak uhelj, s pomočjo čopiča, namočenega v raztopino SLS, in premaz celotnega uhlja v štirih do petih potezah. Uro po obdelavi s SLS sledi nanos 25 µl ustrezno razredčene preskusne snovi, samega nosilca ali pozitivne kontrole (primerjalne ali izvedene pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15 na vsak uhelj.

— *2., 3. in 7. dan:* Ponovi se postopek predhodne obdelave z 1-odstotno vodno raztopino SLS in nanosa preskusne snovi, ki je bil izveden 1. dan.

— *4., 5. in 6. dan:* Brez tretiranja.

— *8. dan:* Zabeleži se masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Približno 24 do 30 ur po začetku nanašanja 7. dne se živali humano usmrti. Ušesne bezgavke ob vsakem ušesu miši se izrežejo in shranijo v fosfatni pufer s soljo (PBS) za vsako žival Podatki in diagrami o identifikaciji in izrezu bezgavk so na voljo v sklicu (22). Za nadaljnje spremljanje odziva kože v glavni študiji se lahko v študijski protokol vključijo dodatni parametri, kot so ocena rdečine ušesa ali meritve debeline ušesa (pridobljene z merilnikom debeline ali preluknjanjem ušes za določitev mase pri obdukciji).

▼M3

Priprava celičnih suspenzij

26. Enotna celična suspenzija iz celic bilateralno izrezanih bezgavk vsake miši se pripravi tako, da se bezgavke namesti med dve objektni stekelci, ki se ju nežno stisne in tako zdrobi bezgavke. Po potrditvi, da se je tkivo na tanko razširilo, se stekelci povlečeta narazen. Tkivo na obeh stekelcih se suspendira s fosfatnim pufrom s soljo tako, da se vsako stekelce drži pod kotom nad petrijevko in spira s PBS ter istočasno strga tkivo s stekelca. Bezgavke živali v negativni kontroli so majhne, zato je treba biti pazljiv, da ne pride do umetnega vpliva na vrednosti SI. Za spiranje obeh stekelc se uporabi skupno 1 ml PBS. Suspenzija iz celic bezgavk v petrijevki se narahlo zmeša s strgalom za celice. Nato se s mikropipeto zbere 20 µL alikvota suspenzije iz celic bezgavk, pri čemer je treba paziti, da se ne pobere membrana, vidna z očesom, in zmeša z 1,98 ml PBS, s čimer dobimo 2 ml vzorec. Z enakim postopkom se nato pripravi drugi 2 ml vzorec, tako da sta za vsako žival pripravljena dva vzorca.

Določitev množenja celic (merjenje vsebnosti adenozin-trifosfata (ATP) pri limfocitih)

27. Povečanje vsebnosti ATP v bezgavkah se meri z metodo luciferina/luciferaze z uporabo kompleta za merjenje ATP, ki meri bioluminiscenco v relativnih luminiscenčnih enotah (RLU). Čas analize od časa usmrtitve živali do merjenja vsebnosti ATP za vsako posamezno žival mora biti enak, in sicer približno 30 minut, ker se vsebnost ATP po usmrtitvi živali postopoma zmanjšuje (12). Zato mora biti serija postopkov od izreza ušesnih bezgavk do merjenja ATP izvedena v 20 minutah z vnaprej določenim časovnim razporedom, ki je enak za vsako žival. Luminiscenca ATP se izmeri v vsakem 2 ml vzorcu, tako da se za vsako žival pridobi dve meritvi ATP. Nato se določi povprečna luminiscenca ATP, ki se uporabi pri nadaljnjih izračunih (glej odstavek 30).

OPAZOVANJA

Klinična opazovanja

28. Vsako miš je treba vsaj enkrat dnevno natančno opazovati glede kliničnih znakov, lokalnega draženja na mestu nanosa ali sistemske toksičnosti. Vsa opazovanja se sistematično zabeležijo v evidence, ki se vodijo za vsako miš. Načrt spremljanja vključuje merila za hitro identifikacijo miši, ki izražajo sistemsko toksičnost, čezmerno draženje kože ali jedkost za kožo zaradi evtanazije (36).

Telesna masa

29. Kot je navedeno v odstavku 25 se telesna masa posameznih živali izmeri na začetku preskusa in ob predvideni humani usmrtitvi.

IZRAČUN REZULTATOV

30. Rezultati za vsako tretirano skupino so izraženi kot povprečni stimulacijski indeks (SI). SI se dobi tako, da se povprečno število relativne luminiscenčne enote/miš v vsaki skupini preskusne snovi in v pozitivni kontrolni skupini deli s povprečnim številom relativne luminiscenčne enote/miš za kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Povprečni stimulacijski indeks za kontrolne skupine z nosilcem je potem 1.

▼M3

31. Rezultat se šteje za pozitivnega, če je SI ≥ 1,8 (10). Vendar se lahko pri odločanju, ali je mejni rezultat pozitiven (tj. vrednost SI med 1,8 in 2,5), uporabijo tudi moč odziva na odmerek, statistični pomen ter doslednost odzivov v topilu/nosilcu in pozitivni kontroli (2) (3) (37).

32. Pri mejnem pozitivnem odzivu s SI med 1,8 in 2,5 bodo uporabniki morda za potrditev, da so takšni rezultati pozitivni, poleg vrednostih SI upoštevali tudi moč odziva na odmerek, dokaze o sistemski toksičnosti ali statistični pomen (10). Upoštevati je treba tudi različne lastnosti preskusne snovi, vključno s strukturno podobnostjo z znanimi povzročitelji preobčutljivosti, povzročanjem čezmernega lokalnega draženja kože pri miši ter naravo opaženega odnosa med odmerkom in odzivom. Ti in drugi razlogi so podrobno obdelani drugje (4).

33. Zbiranje podatkov na ravni posamezne miši bo omogočilo statistično analizo prisotnosti in stopnje odnosa med odmerkom in odzivom v podatkih. Morebitna statistična ocena lahko vključuje oceno odnosa med odmerkom in odzivom ter ustrezno prilagojene primerjave preskusnih skupin (npr. skupina, ki je prejela odmerek v parih, proti primerjavam primerjalnih kontrolnih skupin s topilom/nosilcem). Statistična analiza lahko obsega npr. linearno regresijo ali Williamsov preskus za oceno nihanj odziva na odmerek in Dunnettov preskus za primerjave po parih. Pri izbiri ustrezne metode statistične analize se mora raziskovalec zavedati možnih neenakosti varianc in drugih sorodnih problemov, zaradi katerih je lahko nujna pretvorba podatkov ali neparametrska statistična analiza. V vsakem primeru bo moral raziskovalec morda izvesti izračune stimulacijskega indeksa in statistične analize s podatkovnimi točkami (včasih imenovanimi „izločitve“) in brez njih.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Podatki se povzamejo v obliki preglednice, ki prikazuje vrednosti relativne luminiscenčne enote za posamezno žival, skupinsko povprečje relativne luminiscenčne enote/žival, s tem povezane napake (npr. SD, SEM) in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino s topilom/nosilcem.

Poročilo o preskusu

35. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

preskusne in kontrolne kemikalije:

— identifikacijske podatke (npr. številko CAS in številko EC, če je na voljo; vir; čistost; znane nečistoče, številko serije),

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. hlapnost, stabilnost, topnost),

— če je zmes, sestavo in relativne odstotke sestavin;

topilo/nosilec:

— identifikacijske podatke (čistost, po potrebi koncentracijo, uporabljeno količino),

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca;

▼M3

preskusne živali:

— vir miši seva CBA,

— mikrobiološki status živali, če je znan,

— število in starost živali,

— vir živali, namestitvene pogoje, prehrano, itd.;

preskusni pogoji:

— vir, številko serije in podatke proizvajalca glede zagotavljanja kakovosti/nadzora kakovosti kompleta za ATP,

— podatke o pripravi in uporabi preskusne snovi,

— utemeljitev izbire odmerka (vključno z rezultati predhodnega presejalnega preskusa, če je bil izveden),

— uporabljene koncentracije nosilca in preskusne snovi in skupno količino uporabljene preskusne snovi,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom prehranjevanja, virom vode),

— podatke o programih tretiranja in vzorčenja,

— metode merjenja toksičnosti,

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih ali negativnih,

— podrobnosti o morebitnih odstopanjih protokola in pojasnilo, kako odstopanje vpliva na zasnovo študije in njene rezultate;

preverjanje zanesljivosti:

— povzetek rezultatov zadnjega preverjanja zanesljivosti, vključno z informacijami o uporabljeni preskusni snovi, koncentraciji in nosilcu,

— primerjalne in/ali pretekle pozitivne in primerjalne negativne (topilo/nosilec) kontrolne podatke za preskuševalni laboratorij,

— če primerjalna pozitivna kontrola ni bila vključena, datum in laboratorijsko poročilo nazadnje izvedene redne pozitivne kontrole in poročilo, ki navaja pretekle pozitivne kontrolne podatke za laboratorij, na podlagi katerih je upravičeno neizvajanje primerjalne pozitivne kontrole;

rezultati:

— posamezne mase živali na začetku odmerjanja in ob predvideni usmrtitvi; ter povprečno in povezano napako (npr. SD, SEM) za vsako tretirano skupino,

— časovni potek začetka toksičnosti in njenih znakov, vključno z morebitnim draženjem kože na mestu dajanja za vsako žival,

— čas usmrtitve živali in čas merjenja ATP za vsako žival,

— preglednico z vrednostmi relativne luminiscenčne enote in vrednostmi stimulacijskega indeksa za vsako tretirano skupino odmerka,

— povprečno in povezano napako (npr. SD, SPM) za relativno luminiscenčno enoto/miš za vsako tretirano skupino,

▼**M3**

— izračunan SI in ustrezno merilo spremenljivosti, ki upošteva spremenljivost med posameznimi živalmi tako v preskusni snovi kot kontrolnih skupinah,

— odnos med odmerkom in odzivom,

— po potrebi, statistične analize;

razprava o rezultatih:

— kratke pripombe o rezultatih, analizo odziva na odmerek in po potrebi statistične analize, s sklepom, ali naj se preskusna snov šteje za povzročitelja preobčutljivosti kože.

VIRI

1. OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

2. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf.

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm.

▼**M3**

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.

13. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.

14. OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

15. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

16. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

17. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

19. Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.

20. Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

21. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

22. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf.

23. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

24. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

25. OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

▼**M3**

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

27. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

31. Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

33. Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

35. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

36. OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

37. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health, 53563*–79.

38. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

▼M3

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata za pomen deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (38).

Primerjalna snov: snov, ki povzroča preobčutljivost ali je ne povzroča in se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskušanih snovi; (iii) znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) podporne podatke o znanih učinkih in (v) znano učinkovitost v razponu želene reakcije.

Lažno negativna snov: snov, ki je s preskusno metodo nepravilno opredeljena kot negativna ali neaktivna, čeprav je dejansko pozitivna ali aktivna.

Lažno pozitivna snov: snov, ki je s preskusom nepravilno opredeljena kot pozitivna ali aktivna, čeprav je dejansko negativna ali neaktivna.

Nevarnost: možnost škodljivega učinka na zdravje ali okolje. Do škodljivega učinka pride, če je raven izpostavljenosti dovolj velika.

Ponovljivost v laboratorijih: merjenje obsega, v katerem lahko različni kvalificirani laboratoriji, ki uporabljajo isti protokol in preskušajo iste preskusne snovi, pridejo do kvalitativno in kvantitativno podobnih rezultatov. Ponovljivost v laboratorijih se ugotovi med postopki pred validacijo in med validacijo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi ponovljivost v različnih laboratorijih (38).

Ponovljivost v laboratoriju: določitev obsega, v katerem lahko kvalificirane osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola v različnem času. Imenuje se tudi ponovljivost znotraj laboratorija (38).

Izločitev: izločitev je ugotovitev, ki se izrazito razlikuje od drugih vrednosti v naključnem vzorcu populacije.

Zagotavljanje kakovosti: postopek upravljanja, pri katerem posamezniki, neodvisni od oseb, ki so izvajale preskuse, ocenijo izpolnjevanje laboratorijskih standardov za preskušanje, zahtev in postopkov vodenja evidenc ter natančnosti prenosa podatkov.

Zanesljivost: stopnja ponovljivosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (38).

Preobčutljivost kože: imunološki proces, ki se pojavi, ko je občutljiv posameznik lokalno izpostavljen kemičnemu alergenu, ki na koži sproži imunski odziv in lahko povzroči razvoj preobčutljivosti ob stiku.

Stimulacijski indeks (SI): vrednost, izračunana za oceno morebitne preobčutljivosti kože, ki jo lahko povzroči preskusna snov; je razmerje med množenjem v tretiranih skupinah in množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem.

Preskusna snov (imenovana tudi preskusna kemikalija): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M3

B.51. **PREOBČUTLJIVOST KOŽE: LOKALNA ANALIZA BEZGAVK: BRDU-ELISA**

UVOD

1. Smernice OECD za preskušanje kemikalij in preskusne metode EU se redno preverjajo zaradi znanstvenega napredka, spreminjajočih se zakonodajnih potreb in vprašanj, povezanih z dobrim počutjem živali. Prva preskusna metoda (B.42) za določanje preobčutljivosti kože pri miši, lokalna analiza bezgavk (LLNA; Smernica za preskušanje OECD 429) je bila že preverjena (1 in poglavje B.42 te Priloge). Objavljene so podrobnosti o validaciji LLNA in pregled s tem povezanega dela (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA se za merjenje množenja limfocitov uporablja radioizotopni timidin ali jod, zato je lahko uporaba analize omejena v primerih, kjer je pridobitev, uporaba ali odstranitev radioaktivnosti težavna. LLNA: BrdU-ELISA [encimsko-imunski test, v nadaljnjem besedilu: analiza LLNA: BrdU-ELISA] je neradioaktivna različica LLNA, pri kateri se uporablja radioaktivno neoznačen 5-bromo 2-deoksiuridin (BrdU) (Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov [CAS] št. 59-14-3) v preskusnem sistemu, ki temelji na encimsko-imunskem testu za merjenje množenja limfocitov. Analizo LLNA: BrdU-ELISA je validirala in pregledala mednarodna neodvisna strokovna skupina za ocenjevanje ter jo priporočila kot koristno za opredelitev kemikalij, ki povzročajo preobčutljivost, in kemikalij, ki je ne povzročajo, z nekaterimi omejitvami (10) (11) (12). Ta preskusna metoda je zasnovana za ocenjevanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami (snovmi in zmesmi) pri živalih. Poglavje B.6 te priloge in Smernica za preskušanje OECD 406 uporabljata preskuse na morskih prašičkih, predvsem maksimizacijski in Buehlerjev preskus na morskih prašičkih (13). LLNA (poglavje B.42 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 429) in dve spremembi, pri katerih se radioaktivnost ne uporablja, analiza LLNA: BrdU-ELISA (poglavje B.51 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 B) in analiza LLNA: DA (poglavje B.50 te priloge; Smernica za preskušanje OECD 442 A) zaradi manj pogoste in izpopolnjene uporabe živali zagotavljajo prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih iz metode B.6 in Smernice za preskušanje OECD 406 (13).

2. Podobno kot LLNA tudi analiza LLNA: BrdU-ELISA preučuje indukcijsko fazo preobčutljivosti kože in zagotavlja količinske podatke, ki so primerni za oceno odziva na odmerek. Ker odkriva povzročitelje preobčutljivosti, ne da bi bilo pri tem treba uporabiti radioaktivni označevalec za DNA, se ne pojavljajo vprašanja glede poklicne izpostavljenosti radioaktivnosti in odstranjevanja odpadkov. Zaradi tega bo za odkrivanje povzročiteljev preobčutljivosti morda mogoča pogostejša uporaba miši, zaradi česar bi se lahko še bolj zmanjšala uporaba morskih prašičkov za preskušanje morebitne preobčutljivosti kože (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13).

OPREDELITVE POJMOV

3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

4. Analiza LLNA: BrdU-ELISA je spremenjena metoda LLNA za ugotavljanje morebitne preobčutljivosti kože s kemikalijami, s posebnimi omejitvami. Ni nujno, da to pomeni, da je treba v vseh primerih namesto preskusov na morskih prašičkih ali LLNA (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13) uporabiti analizo LLNA: BrdU-ELISA, temveč da je ta analiza enakovredna in se lahko uporabi kot druga možnost, pri kateri običajno niso več potrebne dodatne potrditve pozitivnih in negativnih rezultatov (10) (11). Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom opravljanja študije upoštevati vse razpoložljive informacije o preskusni snovi. Takšne informacije bodo

▼M3

vključevale vrsto in kemijsko sestavo preskusne snovi; njene fizikalno-kemijske lastnosti; rezultate katerih koli drugih preskusov toksičnosti na preskusni snovi, *in vitro* ali *in vivo*; in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. Te informacije je treba upoštevati, da se določi, ali je metoda LLNA: BrdU-ELISA primerna za preskusno snov (glede na nezdružljivost omejenega števila vrst kemikalij z analizo LLNA: BrdU-ELISA [glej odstavek 5]) in za lažjo izbiro odmerka.

5. Analiza LLNA: BrdU-ELISA je metoda *in vivo* in posledično ne odpravlja uporabe živali pri ocenjevanju delovanj, ki povzročajo alergijsko preobčutljivost ob stiku. Vendar ima možnost, da v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih (B.6; Smernica za preskušanje OECD 406) (13), zmanjša število živali, potrebnih v ta namen. Poleg tega nudi analiza LLNA: BrdU-ELISA znatno izboljšanje načina, kako se živali uporabljajo za preskušanje alergijske preobčutljivosti ob stiku, saj v nasprotju z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 ne zahteva, da se povzročijo izzvane reakcije prekomerne občutljivosti kože. Poleg tega analiza LLNA: BrdU-ELISA za razliko od maksimizacijskega preskusa na morskih prašičkih ne zahteva uporabe pomožnega preskusa (poglavje B.6 te priloge, 13). S tem analiza LLNA: BrdU-ELISA zmanjšuje trpljenje živali. Kljub prednostim analize LLNA: BrdU-ELISA v primerjavi z metodo B.6 in Smernico za preskušanje OECD 406 (13) obstajajo nekatere omejitve, zaradi katerih je lahko nujna uporaba metode B.6 ali Smernice za preskušanje OECD 406 (npr. preskušanje določenih kovin, lažni pozitivni izidi pri nekaterih dražilnih snoveh za kožo [kot so nekatere vrste površinsko razgradljivih kemikalij] (6) (1 in poglavje B.42 te priloge), topnost preskusne snovi). Poleg tega je zaradi kemijskih razredov ali snovi s funkcionalnimi skupinami, za katere se je izkazalo, da lahko delujejo kot moteči dejavniki (15), lahko potrebna uporaba preskusov na morskih prašičkih (tj. B.6; Smernica za preskušanje OECD 406 (13)). Za omejitve, določene za LLNA (1 in poglavje B.42 te priloge), je bilo priporočeno, da se uporabljajo tudi za analizo LLNA: BrdU-ELISA (10). Razen takšnih določenih omejitev bi morala biti analiza LLNA: BrdU-ELISA primerna za preskušanje katerih koli kemikalij, razen če so s temi kemikalijami povezane lastnosti, ki lahko ovirajo natančnost analize LLNA: BrdU-ELISA. Poleg tega je treba razmisliti o možnosti mejnih pozitivnih rezultatov v primerih, ko so dobljene vrednosti stimulacijskega indeksa (SI) med 1,6 in 1,9 (glej odstavke 31–32). To temelji na podatkovni zbirki za validacijo s 43 snovmi s stimulacijskim indeksom ≥ 1,6 (glej odstavek 6), pri kateri je analiza LLNA: BrdU-ELISA pravilno opredelila vseh 32 povzročiteljev preobčutljivosti pri LLNA, vendar je nepravilno opredelila dve od 11 snovi, ki pri LLNA ne povzročajo preobčutljivosti z vrednostmi stimulacijskega indeksa med 1,6 in 1,9 (tj. mejno pozitivna vrednost) (10). Ker pa je bil za določanje vrednosti stimulacijskega indeksa in izračun predvidljivih lastnosti preskusa uporabljen isti nabor podatkov, so lahko navedeni rezultati pretirana ocena dejanskih predvidljivih lastnosti.

NAČELA METODE PRESKUŠANJA

6. Osnovno načelo, na katerem temelji analiza LLNA: BrdU-ELISA, je, da povzročitelji preobčutljivosti povzročijo množenje limfocitov v bezgavkah, ki drenirajo območje nanosa preskusne snovi. To množenje je sorazmerno z odmerkom in močjo uporabljenega alergena in je preprosto sredstvo za doseganje količinske izmere preobčutljivosti. Množenje se izmeri s primerjavo povprečnega množenja v vsaki preskusni skupini in povprečnega množenja v kontrolni skupini, tretirani z nosilcem. Določi se razmerje med povprečnim množenjem v vsaki tretirani skupini in povprečnim množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem, ki se imenuje stimulacijski indeks (SI) in mora biti ≥ 1,6, preden je nadaljnje ocenjevanje preskusne snovi kot možnega povzročitelja preobčutljivosti kože utemeljeno. Opisani postopki temeljijo na merjenju vsebnosti BrdU, ki kaže

▼M3

povečano število množečih se celic v ušesnih bezgavkah. BrdU je analog timidina in se v množeče se celice DNA vključi na podoben način. Vključitev BrdU se meri z encimsko-imunskim testom, ki uporablja protitelo, specifično za BrdU, ki je označeno tudi s peroksidazo. Ko se doda substrat, peroksidaza reagira s substratom in nastane obarvan produkt, ki je količinsko opredeljen pri določeni absorbanci z uporabo čitalca mikrotiterskih plošč.

OPIS ANALIZE

Izbira živalskih vrst

7. Izbrana vrsta za ta preskus je miš. Validacijske študije za analizo LLNA: BrdU-ELISA so bile izvedene samo s sevom CBA/JN, ki je zato priporočeni sev (10) (12). Uporabijo se mlade odrasle mišje samice, ki še niso kotile in niso breje. Na začetku študije morajo biti živali stare 8–12 tednov, odstopanje mase živali pa mora biti čim manjše in ne sme presegati 20 % povprečne mase. Namesto tega se lahko uporabi druge seve in samce, ko je dobljenih dovolj podatkov za prikaz, da ne obstajajo značilne razlike v odzivu pri analizi LLNA: BrdU-ELISA.

Bivalni in prehranjevalni pogoji

8. Miši morajo biti skupinsko nastanjene (16), razen če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev za njihovo ločeno nastanitev. Temperatura v prostoru za poskusne živali mora biti 22 ± 3 °C. Čeprav mora biti relativna vlažnost najmanj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, mora biti ciljna vlažnost, razen med čiščenjem prostora, 50 do 60 %. Osvetlitev naj bo umetna, in sicer 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo.

Priprava živali

9. Živali se naključno izberejo, označijo tako, da je omogočeno posamično prepoznavanje (vendar ne s katero od oblik ušesnih oznak), in zadržijo v kletkah najmanj pet dni pred začetkom dajanja odmerka, da se lahko prilagodijo laboratorijskim razmeram. Pred začetkom tretiranja se vse živali pregledajo, da se zagotovi, da nimajo opaznih kožnih lezij.

Priprava preskusnih raztopin

10. Trdne kemikalije se pred nanosom na uho miši raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih in po potrebi razredčijo. Tekoče kemikalije se lahko nanesejo nerazredčene ali pa se razredčijo pred dajanjem odmerka. Pri netopnih kemikalijah, kot so tiste, ki se običajno uporabljajo v medicinskih pripomočkih, je treba uporabiti močno povečano ekstrakcijo v ustreznem topilu, da se odkrije vse ekstraktibilne sestavine za preskušanje pred nanosom na uho miši. Preskusne snovi je treba pripravljati dnevno, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preverjanje zanesljivosti

11. Za prikaz ustrezne učinkovitosti analize se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki se odzovejo z ustrezno in ponovljivo občutljivostjo kot preskusna snov, ki povzroča preobčutljivost, za katero je stopnja reakcije natančno opredeljena. Uporaba primerjalne pozitivne kontrole je priporočena, saj pokaže zmožnost laboratorija, da uspešno izvede vsako analizo, ter omogoča ocenjevanje ponovljivosti in primerljivosti v enem ali več laboratorijih. Tudi nekateri regulativni organi zahtevajo uporabo pozitivne

▼M3

kontrole pri vsaki raziskavi, zato se uporabnikom priporoča, da se pred izvedbo analize LLNA: BrdU-ELISA posvetujejo s pristojnimi organi. V skladu s tem se priporoča redna uporaba primerjalne pozitivne kontrole, saj tako ni potrebno dodatno preskušanje na živalih za izpolnitev zahtev, ki se lahko pojavijo zaradi uporabe redne pozitivne kontrole (glej odstavek 12). Pozitivna kontrola mora povzročiti pozitiven odziv analize LLNA: BrdU-ELISA na raven izpostavljenosti, za katero se pričakuje, da bo dala večji stimulacijski indeks SI ≥ 1,6 kot negativna kontrolna skupina. Odmerek pozitivne kontrole je treba izbrati tako, da ne povzroči čezmernega draženja kože ali sistemske toksičnosti in da je indukcija ponovljiva, vendar ne čezmerna (tj. SI > 14 bi se štel za čezmernega). Priporočena pozitivna kontrola je 25-odstotni heksil cimetov aldehid (CAS št. 101-86-0) in 25-odstotni evgenol (št. CAS 97-53-0) v acetonu: olivnem olju (4:1, v/v). V nekaterih okoliščinah se lahko ob ustrezni utemeljitvi uporabijo druge pozitivne kontrole, ki izpolnjujejo zgornja merila.

12. Običajno je uporaba pozitivne kontrolne skupine priporočena, lahko pa obstajajo okoliščine, v katerih redno preskušanje (tj. v razmikih ≤ 6 mesecev) pozitivne kontrole morda zadošča za laboratorije, ki redno izvajajo analizo LLNA: BrdU-ELISA (tj. izvajajo analizo LLNA: BrdU-ELISA vsaj enkrat mesečno) in imajo vzpostavljeno zbirko preteklih podatkov o pozitivnih kontrolah, ki dokazuje zmožnost laboratorija, da pridobi ponovljive in natančne rezultate s pozitivnimi kontrolami. Ustrezna strokovnost pri izvajanju analize LLNA: BrdU-ELISA se lahko uspešno dokaže z dobivanjem doslednih pozitivnih rezultatov s pozitivno kontrolo pri vsaj desetih neodvisnih preskusih, izvedenih v razumnem časovnem obdobju (tj. v manj kot enem letu).

13. Primerjalno pozitivno kontrolno skupino je treba vključiti vedno, kadar pride do postopkovne spremembe pri analizi LLNA: BrdU-ELISA (npr. zamenjava usposobljenega osebja, zamenjava materiala za preskusno metodo in/ali reagentov, zamenjava opreme za preskusno metodo, zamenjava vira preskusnih živali), takšne spremembe pa je treba vedno zabeležiti v laboratorijskih poročilih. Pri odločanju o nujnosti vzpostavitve nove zbirke preteklih podatkov za beleženje doslednosti pri rezultatih pozitivne kontrole je treba upoštevati učinek, ki ga imajo te spremembe na ustreznost predhodno vzpostavljene zbirke preteklih podatkov.

14. Raziskovalci se morajo zavedati, da odločitev o izvajanju redne namesto primerjalne pozitivne kontrolne študije vpliva na ustreznost in sprejemljivost negativnih rezultatov študije, pridobljenih brez primerjalne pozitivne kontrole v razmiku med rednimi pozitivnimi kontrolnimi študijami. Na primer, če je rezultat, pridobljen z redno pozitivno kontrolno študijo, lažno negativen, so lahko vprašljivi negativni rezultati preskusne snovi, pridobljeni v času med zadnjo sprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo in nesprejemljivo redno pozitivno kontrolno študijo. Pri odločanju, ali vključiti primerjalne pozitivne kontrole ali izvajati samo redne pozitivne kontrole, je treba skrbno preučiti posledice teh rezultatov. Treba je razmisliti tudi o uporabi manjšega števila živali v primerjalni pozitivni kontrolni skupini, če je to znanstveno utemeljeno in če laboratorij na podlagi preteklih podatkov, značilnih za laboratorij, dokaže, da se lahko uporabi manjše število miši (17).

15. Čeprav je treba pozitivno kontrolo preskusiti v nosilcu, za katerega je znano, da povzroča dosleden odziv (npr. aceton: olivno olje; 4:1, v/v), lahko obstajajo nekatere zakonodajne okoliščine, ko je potrebno tudi preskušanje v nestandardnem nosilcu (klinično/kemično ustrezne sestave) (18). Če se primerjalna pozitivna kontrola preskuša v drugem nosilcu kot preskusna snov, je treba za primerjalno pozitivno kontrolo vključiti ločen kontrolni nosilec.

▼M3

16. V primerih, kjer se ocenjujejo preskusne snovi za poseben kemijski razred ali razpon reakcij, so lahko primerjalne snovi uporabne tudi za dokaz, da preskusna metoda deluje pravilno za odkrivanje morebitne preobčutljivosti kože pri teh vrstah preskusnih snovi. Ustrezne primerjalne snovi morajo imeti naslednje lastnosti:

— strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskusne snovi, ki se preskuša,

— znane fizikalno-kemijske lastnosti,

— podporne podatke iz analiz LLNA: BrdU-ELISA,

— podporne podatke od drugih živalskih modelov in/ali ljudi.

PRESKUSNI POSTOPEK

Število živali in velikost odmerkov

17. Na skupino odmerka se uporabijo najmanj štiri živali z najmanj tremi koncentracijami preskusne snovi, poleg tega pa še primerjalna negativna kontrolna skupina, tretirana zgolj z nosilcem za preskusno snov, in pozitivna kontrolna skupina (primerjalna ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15). Treba je razmisliti o preskušanju več odmerkov pozitivne kontrole, zlasti če se pozitivna kontrola preskuša občasno. Živali v kontrolnih skupinah je treba, razen če se ne tretirajo s preskusno snovjo, obravnavati in tretirati na enak način kot živali v tretiranih skupinah.

18. Izbira odmerka in nosilca mora temeljiti na priporočilih iz sklicev (2) in (19). Zaporedni odmerki se običajno izberejo iz ustrezne serije koncentracij, kot so 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % itd. Izbira uporabljene serije koncentracij mora biti ustrezno znanstveno utemeljena. Kadar so na voljo, je treba pri izbiri treh zaporednih koncentracij upoštevati vse obstoječe toksikološke informacije (npr. akutno toksičnost in draženje kože) ter strukturne in fizikalno-kemijske informacije o želeni preskusni snovi (in/ali strukturno povezani snovi), tako da je pri največji koncentraciji izpostavljenost največja, hkrati pa ni sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože (19) (20 in poglavje B.4 te Priloge). Če takšne informacije niso na voljo, je morda najprej potreben predhodni presejalni preskus (glej odstavke 21–24).

19. Nosilec ne sme ovirati rezultatov preskusa ali vplivati nanje, izbere pa se na podlagi povečevanja topnosti, da se med pripravljanjem raztopine/suspenzije, ki je primerna za uporabo preskusne snov, pridobi največjo možno koncentracijo. Priporočljivi nosilci so aceton: olivno olje (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol in dimetil sulfoksid (6), vendar se lahko uporabljajo tudi drugi, če je zagotovljena ustrezna znanstvena utemeljitev. V nekaterih okoliščinah je morda treba kot dodatno kontrolo uporabiti klinično ustrezno topilo ali trgovsko sestavo, v kateri se trži preskusna snov. Paziti je treba zlasti, da so v nosilni sistem vključene hidrofilne preskusne snovi, ki vlažijo kožo in se ne izsušijo takoj, z vključitvijo ustreznih pospeševalcev raztapljanja (npr. 1-odstotnim Pluronic® L92). Zato se je treba izogibati povsem vodenim nosilcem.

▼M3

20. Obdelava bezgavk posamezne miši omogoča oceno spremenljivosti med posameznimi živalmi in statistično primerjavo razlik med meritvami preskusne snovi in primerjalne kontrolne skupine z nosilcem (glej odstavek 33). Poleg tega je ocena možnosti glede zmanjšanja števila miši v pozitivni kontrolni skupini izvedljiva samo, če se zbira podatke o posameznih živalih (17). Poleg tega nekateri regulativni organi zahtevajo zbiranje podatkov o posameznih živalih. Redno zbiranje podatkov o posameznih živalih zagotavlja prednosti glede dobrega počutja živali, saj se s tem prepreči dvojno preskušanje, ki bi bilo potrebno, če bi bilo treba rezultate, prvotno zbrane na en način (npr. preko združenih podatkov o živalih) zaradi drugih zahtev regulativnih organov (npr. glede podatkov o posameznih živalih) kasneje ponovno preučiti.

Predhodni presejalni preskus

21. Če informacije za določitev največjega odmerka za preskušanje niso na voljo (glej odstavek 18), je treba izvesti predhodni presejalni preskus, da se določi ustrezna velikost odmerka za preskušanje z analizo LLNA: BrdU-ELISA. Namen predhodnega presejalnega preskusa je zagotoviti smernice za izbiro največje velikosti odmerka za uporabo v glavni študiji analize LLNA: BrdU-ELISA v primerih, ko ni na voljo informacij o koncentraciji, ki povzroči sistemsko toksičnost (glej odstavek 24) in/ali čezmerno draženje kože (glej odstavek 23). Največja velikost odmerka je 100-odstotna koncentracija preskusne snovi za tekočine ali najvišja možna koncentracija za trdne snovi ali suspenzije.

22. Predhodni presejalni preskus se izvede v pogojih, ki so enaki tistim v glavni študiji analize LLNA: BrdU-ELISA, s to razliko, da se ne izvede ocena množenja v bezgavkah in da se lahko uporabi manj živali na skupino odmerka. Predlaga se uporaba ene ali dveh živali na skupino odmerka. Vse miši se opazuje dnevno glede kliničnih znakov sistemske toksičnosti ali lokalnega draženja na mestu nanosa. Telesna masa se zabeleži pred preskusom in pred usmrtitvijo (6. dan). Obe ušesi vsake miši se opazuje glede rdečine in oceni s pomočjo preglednice 1 (20 in poglavje B.4 te priloge). Meritve debeline ušesa se izvedejo z napravo za merjenje debeline (npr. digitalnim mikrometrom ali merilnikom debeline s številčnico) 1. dan (pred odmerkom), 3. dan (približno 48 ur pred prvim odmerkom) in 6. dan. Poleg tega se lahko 6. dan debelino ušesa določi s preluknjanjem ušes za določitev mase, ki se izvede po humani usmrtitvi živali. Znak za čezmerno draženje je rdečina z oceno $\geq$ 3 in/ali povečana debelina ušesa za $\geq$ 25 % na kateri koli dan merjenja (21) (22). Največji odmerek, izbran za glavno študijo analize LLNA: BrdU-ELISA, je naslednji nižji odmerek v seriji koncentracij iz predhodnega presejalnega preskusa (glej odstavek 18), ki ne povzroči sistemske toksičnosti in/ali čezmernega draženja kože.

Preglednica 1

Ocena rdečine

Ugotovitev	Ocena
Rdečine ni	0
Neznatna rdečina (komajda opazna)	1
Zelo razločna rdečina	2

▼M3

Ugotovitev	Ocena
Zmerna do močna rdečina	3
Močna rdečina (rdečina rdeče pese) in nastanek krast ovirata razvrstitev rdečine	4

23. Poleg 25-odstotnega povečanja debeline ušesa (21) (22) se za opredelitev dražilnih snovi pri LLNA uporablja tudi statistično značilno povečanje debeline ušesa tretirane miši v primerjavi s kontrolno mišjo (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Ker pa se lahko statistično značilno povečanje pojavi tudi pri debelini ušesa, manjši od 25 %, ni izrecno povezano s čezmernim draženjem (25) (26) (27) (28) (29).

24. Naslednje klinične ugotovitve lahko nakazujejo sistemsko toksičnost (30), kadar se uporabljajo kot del celovite ocene, in zato lahko pokažejo največjo velikost odmerka za uporabo v glavni analizi LLNA: BrdU-ELISA: spremembe v delovanju živčnega sistema (npr. piloerekcija, ataksija, tremorji in krči); vedenjske spremembe (npr. agresivnost, spremembe glede nege, opazna sprememba stopnje aktivnosti); spremembe dihanja (npr. spremembe frekvence in intenzivnosti dihanja, kot so dispneja, zasoplost in hropenje) in spremembe glede uživanja hrane in vode. Poleg tega je treba pri oceni upoštevati znake letargije in/ali neodzivnosti ter morebitne klinične znake bolečine in trpljenja, ki niso samo blagi ali trenutni, ali zmanjšanje telesne mase za > 5 % od 1. do 6. dne ter smrtnost. Umirajoče živali ali živali, ki kažejo znake hudega in dolgotrajnega trpljenja, se usmrtijo na human način (31).

Načrt za poskus glavne študije

25. Načrt za poskus analize je naslednji:

— *1. dan:* Posamično ugotovljena in zabeležena masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Nanos 25 µl ustrezno razredčene preskusne snovi, samega nosilca ali pozitivne kontrole (primerjalne ali izvedena pred kratkim, odvisno od politike laboratorija pri upoštevanju odstavkov 11–15) na vsak uhelj.

— *2. in 3. dan:* Ponovi se postopek nanosa, ki je bil izveden 1. dan.

— *4. dan:* Brez tretiranja.

— *5. dan:* Intraperitonealno vbrizganje 0,5 ml (5 mg/miš) raztopine BrdU (10 mg/ml).

— *6. dan:* Zabeleži se masa vsake živali in morebitne klinične ugotovitve. Približno 24 ur po vbrizgani BrdU se živali humano usmrti. Ušesne bezgavke ob vsakem ušesu miši se izrežejo in shranijo v fosfatni pufer s soljo (PBS) za vsako žival Podatki in diagrami o identifikaciji in izrezu bezgavk so na voljo v sklicu (17). Za nadaljnje spremljanje odziva kože v glavni študiji se lahko v študijski protokol vključijo dodatni parametri, kot so ocena rdečine ušesa ali meritve debeline ušesa (pridobljene z merilnikom debeline ali preluknjanjem ušes za določitev mase pri obdukciji).

▼M3

Priprava celičnih suspenzij

26. Enotna celična suspenzija iz celic bilateralno izrezanih bezgavk vsake miši se pripravi z blago mehanično disagregacijo skozi žično mrežo iz nerjavnega jekla z velikostjo odprtin 200 mikronov ali drugo uveljavljeno tehniko za pripravo enotne celične suspenzije (npr. uporabo plastičnega pestila za enkratno uporabo za drobljenje bezgavk, ki mu sledi prehajanje skozi mrežo iz najlona z velikostjo odprtin 70 mikronov). Postopek priprave suspenzije iz celic bezgavk je pri tej analizi bistvenega pomena, zato mora vsak izvajalec predhodno pridobiti te spretnosti. Bezgavke živali v negativni kontroli so majhne, zato je treba biti pazljiv, da ne pride do umetnega vpliva na vrednosti SI. V vsakem primeru je treba ciljni volumen suspenzije iz celic bezgavk prilagoditi določenemu optimiziranemu volumnu (približno 15 ml). Optimiziran volumen temelji na doseganju povprečne absorbance negativne kontrolne skupine v razponu 0,1–0,2.

Določitev množenja celic (merjenje vsebnosti bromdeoksiuridina (BrdU) v DNA limfocitov)

27. BrdU se meri z encimsko-imunskim testom z uporabo tržnega kompleta (npr. Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija, št. v katalogu 11 647 229 001). Na kratko, v vdolbinice treh mikroplošč z ravnim dnom se doda 100 μL suspenzije iz celic bezgavk. Po fiksaciji in denaturaciji celic iz bezgavk se v vsako vdolbinico doda anti-BrdU protitelo in omogoči, da pride do reakcije. Nato se anti-BrdU protitelo odstrani s spiranjem, doda se raztopina substrata in omogoči se, da nastane kromogen. Nato se izmeri absorbanca pri 370 nm z referenčno valovno dolžino 492 nm. V vseh primerih morajo biti preskusni pogoji analize optimizirani (glej odstavek 26).

OPAZOVANJA

Klinična opazovanja

28. Vsako miš je treba vsaj enkrat dnevno natančno opazovati glede kliničnih znakov, lokalnega draženja na mestu nanosa ali sistemske toksičnosti. Vsa opazovanja se sistematično zabeležijo v evidence, ki se vodijo za vsako miš. Načrt spremljanja vključuje merila za hitro identifikacijo miši, ki izražajo sistemsko toksičnost, čezmerno draženje kože ali jedkost za kožo zaradi evtanazije (31).

Telesna masa

29. Kot je navedeno v odstavku 25, se telesna masa posameznih živali izmeri na začetku preskusa in ob predvideni humani usmrtitvi.

IZRAČUN REZULTATOV

30. Rezultati za vsako tretirano skupino so izraženi kot povprečni stimulacijski indeks (SI). SI se dobi tako, da se povprečni indeks označevanja za BrdU/miš v vsaki skupini preskusne snovi in v pozitivni kontrolni skupini deli s povprečnim indeksom označevanja za BrdU za kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Povprečni stimulacijski indeks za kontrolne skupine z nosilcem je potem 1.

Indeks označevanja za BrdU je opredeljen kot:

$$\text{indeks označevanja za BrdU} = (ABS_{em} - \text{ABS blank}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blank}_{ref})$$

pri čemer je em = valovna dolžina emisije in ref = referenčna valovna dolžina.

▼M3

31. Rezultat se šteje za pozitivnega, če je SI ≥ 1,6 (10). Vendar se lahko pri odločanju, ali je mejni rezultat pozitiven (tj. vrednost SI med 1,6 in 1,9), uporabijo tudi moč odziva na odmerek, statistični pomen ter doslednost odzivov v topilu/nosilcu in pozitivni kontroli (3) (6) (32).

32. Pri mejnem pozitivnem odzivu s SI med 1,6 in 1,9 bodo uporabniki morda za potrditev, da so takšni rezultati pozitivni, poleg vrednosti SI upoštevali tudi moč odziva na odmerek, dokaze o sistemski toksičnosti ali statistični pomen (10). Upoštevati je treba tudi različne lastnosti preskusne snovi, vključno s strukturno podobnostjo z znanimi povzročitelji preobčutljivosti, povzročanjem čezmernega lokalnega draženja kože pri miši ter naravo opaženega odnosa med odmerkom in odzivom. Ti in drugi razlogi so podrobno obdelani drugje (4).

33. Zbiranje podatkov na ravni posamezne miši bo omogočilo statistično analizo prisotnosti in stopnje odnosa med odmerkom in odzivom v podatkih. Morebitna statistična ocena lahko vključuje oceno odnosa med odmerkom in odzivom ter ustrezno prilagojene primerjave preskusnih skupin (npr. skupina, ki je prejela odmerek v parih, proti primerjavam primerjalnih kontrolnih skupin s topilom/nosilcem). Statistična analiza lahko obsega npr. linearno regresijo ali Williamsov preskus za oceno nihanj odziva na odmerek in Dunnettov preskus za primerjave po parih. Pri izbiri ustrezne metode statistične analize se mora raziskovalec zavedati možnih neenakosti varianc in drugih sorodnih problemov, zaradi katerih je lahko nujna pretvorba podatkov ali neparametrska statistična analiza. V vsakem primeru bo moral raziskovalec morda izvesti izračune stimulacijskega indeksa in statistične analize s podatkovnimi točkami (včasih imenovanimi „izločitve“) in brez njih.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Podatki se povzamejo v obliki preglednice, ki prikazuje vrednosti indeksa označevanja za BrdU, skupinsko povprečje indeksa označevanja za BrdU/žival, s tem povezane napake (npr. SD, SEM) in povprečni SI za vsako skupino odmerka v primerjavi s primerjalno kontrolno skupino s topilom/nosilcem.

Poročilo o preskusu

35. Poročilo o preskusu vsebuje naslednje informacije:

preskusne in kontrolne kemikalije:

— identifikacijske podatke (npr. številko CAS in številko EC, če je na voljo; vir; čistost; znane nečistoče, številko serije),

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. hlapnost, stabilnost, topnost),

— če je zmes, sestavo in relativne odstotke sestavin;

topilo/nosilec:

— identifikacijske podatke (čistost, po potrebi koncentracijo, uporabljeno količino),

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca;

▼M3

preskusne živali:

— vir miši seva CBA,

— mikrobiološki status živali, če je znan,

— število in starost živali,

— število, starost in spol živali;

preskusni pogoji:

— vir, številko serije in podatke proizvajalca glede zagotavljanja kakovosti/nadzora kakovosti (občutljivost na protitelesa in specifičnost ter mejo zaznavnosti) kompleta za encimsko-imunski test,

— podatke o pripravi in uporabi preskusne snovi,

— utemeljitev izbire odmerka (vključno z rezultati predhodnega presejalnega preskusa, če je bil izveden),

— uporabljene koncentracije nosilca in preskusne snovi in skupno količino uporabljene preskusne snovi,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom prehranjevanja, virom vode),

— podatke o programih tretiranja in vzorčenja,

— metode merjenja toksičnosti,

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih ali negativnih,

— podrobnosti o morebitnih odstopanjih protokola in pojasnilo, kako odstopanje vpliva na zasnovo študije in njene rezultate;

preverjanje zanesljivosti:

— povzetek rezultatov zadnjega preverjanja zanesljivosti, vključno z informacijami o uporabljeni preskusni snovi, koncentraciji in nosilcu,

— primerjalne in/ali pretekle pozitivne in primerjalne negativne (topilo/nosilec) kontrolne podatke za preskuševalni laboratorij,

— če primerjalna pozitivna kontrola ni bila vključena, datum in laboratorijsko poročilo nazadnje izvedene redne pozitivne kontrole in poročilo, ki navaja pretekle pozitivne kontrolne podatke za laboratorij, na podlagi katerih je upravičeno neizvajanje primerjalne pozitivne kontrole;

rezultati:

— posamezne mase živali na začetku odmerjanja in ob predvideni humani usmrtitvi; ter povprečno in povezano napako (npr. SD, SEM) za vsako tretirano skupino,

— časovni potek začetka toksičnosti in njenih znakov, vključno z morebitnim draženjem kože na mestu dajanja za vsako žival,

— preglednico s kazalniki označevanja za BrdU za vsako posamezno miš in vrednosti SI za vsako tretirano skupino,

— povprečno in povezano napako (npr. SD, SPM) za indeks označevanja za BrdU/miš za vsako tretirano skupino,

▼M3

— izračunan SI in ustrezno merilo spremenljivosti, ki upošteva spremenljivost med posameznimi živalmi tako v preskusni snovi kot kontrolnih skupinah,

— odnos med odmerkom in odzivom,

— po potrebi, statistične analize;

razprava o rezultatih:

— kratke pripombe o rezultatih, analizo odziva na odmerek in po potrebi statistične analize, s sklepom, ali naj se preskusna snov šteje za povzročitelja preobčutljivosti kože.

VIRI

1. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

2. Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf.

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm.

▼M3

11. (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

13. OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

14. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

15. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

17. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf.

18. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

19. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

20. OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

21. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

22. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

23. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

25. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

26. Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

27. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

28. Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

29. Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

30. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Na voljo na spletni strani: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

31. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

32. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

33. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Na voljo na spletni strani: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

▼M3

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Natančnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode z uveljavljenimi referenčnimi vrednostmi. To je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto izmenično uporabljata za pomen deleža ustreznih rezultatov preskusne metode (33).

Primerjalna snov: snov, ki povzroča preobčutljivost ali je ne povzroča in se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno snovjo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) trajen in zanesljiv vir; (ii) strukturno in funkcijsko podobnost z razredom preskušanih snovi; (iii) znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) podporne podatke o znanih učinkih in (v) znano učinkovitost v razponu želene reakcije.

Lažno negativna snov: preskusna snov, ki je s preskusno metodo nepravilno opredeljena kot negativna ali neaktivna, čeprav je dejansko pozitivna ali aktivna (33).

Lažno pozitivna snov: preskusna snov, ki je s preskusom nepravilno opredeljena kot pozitivna ali aktivna, čeprav je dejansko negativna ali neaktivna (33).

Nevarnost: možnost škodljivega učinka na zdravje ali okolje. Do škodljivega učinka pride, če je raven izpostavljenosti dovolj visoka.

Ponovljivost v laboratorijih: merjenje obsega, v katerem lahko različni kvalificirani laboratoriji, ki uporabljajo isti protokol in preskušajo iste preskusne snovi, pridejo do kvalitativno in kvantitativno podobnih rezultatov. Ponovljivost v laboratorijih se ugotovi med postopki pred validacijo in med validacijo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi ponovljivost v različnih laboratorijih (33).

Ponovljivost v laboratoriju: določitev, obsega, v katerem lahko kvalificirane osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola v različnem času. Imenuje se tudi ponovljivost znotraj laboratorija (33).

Izločitev: izločitev je ugotovitev, ki se izrazito razlikuje od drugih vrednosti v naključnem vzorcu populacije.

Zagotavljanje kakovosti: postopek upravljanja, pri katerem posamezniki, neodvisni od oseb, ki so izvajale preskuse, ocenijo izpolnjevanje laboratorijskih standardov za preskušanje, zahtev in postopkov vodenja evidenc ter natančnosti prenosa podatkov.

Zanesljivost: stopnja ponovljivosti preskusne metode v laboratorijih in med njimi v določenem časovnem obdobju pri uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom ponovljivosti v enem ali več laboratorijih (33).

Preobčutljivost kože: imunološki proces, ki se pojavi, ko je občutljiv posameznik lokalno izpostavljen kemičnemu alergenu, ki na koži sproži imunski odziv in lahko povzroči razvoj preobčutljivosti ob stiku.

Stimulacijski indeks (SI): vrednost, izračunana za oceno morebitne preobčutljivosti kože, ki jo lahko povzroči preskusna snov; je razmerje med množenjem v tretiranih skupinah in množenjem v primerjalni kontrolni skupini z nosilcem.

Preskusna snov (imenovana tudi preskusna kemikalija): katera koli snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

B.52 AKUTNA STRUPENOST PRI VDIHAVANJU – METODA RAZREDOV AKUTNE STRUPENOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 436 (2009). Prvotna TG 403 v zvezi z akutno strupenostjo pri vdihavanju je bila sprejeta leta 1981 in je bila odtlej revidirana (glej poglavje B.2 te priloge (1)). Priprava metode razredov akutne strupenosti (ATC) pri vdihavanju (2) (3) (4) je bila ocenjena kot ustrezna po sprejetju revidirane oralne metode ATC (poglavje B.1 tris te priloge) (5). Retrospektivna ocena učinkovitosti preskusne metode ATC za akutno strupenost pri vdihavanju je pokazala, da je primerna za namene razvrščanja in označevanja (6). Preskusna metoda ATC pri vdihavanju bo omogočila uporabo zaporednih faz točno določenih ciljnih koncentracij za zagotovitev razvrstitve strupenosti preskusne kemikalije. Kot ključna končna točka se uporablja smrtnost, vendar je treba živali, ki doživljajo hude bolečine ali muke oziroma ki trpijo ali katerih smrt je neizbežna, humano usmrtiti, da se njihovo trpljenje čim bolj zmanjša. Napotki o humanih končnih točkah so na voljo v Dokumentu s smernicami OECD št. 19 (7).

2. Napotki glede izvedbe in razlage te preskusne metode so na voljo v Dokumentu s smernicami št. 39 za preskušanje akutne strupenosti pri vdihavanju (GD 39) (8).

3. Pojmi, ki se uporabljajo v okviru te preskusne metode, so opredeljeni v Dodatku 1 in v GD 39 (8).

4. S to preskusno metodo se pridobivajo informacije o nevarnih lastnostih in omogoča razvrstitev preskusne kemikalije v skladu z Uredbo (ES) št. 1272/2008 za razvrščanje kemikalij, ki povzročajo akutno strupenost (9). Če so potrebne ocenjene vrednosti LC_{50} ali analize odziva na koncentracijo, je primerno uporabiti preskusno metodo iz poglavja B.2 te priloge (1). Več napotkov o izbiri preskusne metode je na voljo v GD 39 (8). Ta preskusna metoda ni posebej namenjena preskušanju posebnih materialov, kot so slabo topni izometrični ali vlaknati materiali ali proizvedeni nanomateriali.

ZAČETNI PREUDARKI

5. Da se uporaba živali kar najbolj zmanjša, mora preskuševalni laboratorij pred razmislekom o preskušanju v skladu s to preskusno metodo preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji, vključno z obstoječimi študijami, katerih podatki bi omogočili izognitev dodatnemu preskušanju. Informacije, ki lahko pomagajo pri izbiri najprimernejše vrste, seva, spola, načina izpostavljenosti in ustreznih preskusnih koncentracij, vključujejo identiteto, kemijsko strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije; rezultate morebitnih preskusov strupenosti *in vitro* ali *in vivo*; pričakovane uporabe in potencial za izpostavljenost ljudi; razpoložljive podatke (Q)SAR in toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah. S to preskusno metodo se ne smejo preskušati koncentracije, za katere se pričakuje, da bodo zaradi jedkega [1] ali izrazito dražilnega delovanja povzročile hude bolečine in trpljenje (glej GD 39 (8)).

[1] Ocena jedkosti lahko temelji na strokovni presoji, v kateri se uporabijo dokazi, kot so: izkušnje pri ljudeh in živalih, obstoječi podatki (*in vitro*), npr. poglavji B.40 (10) ali B.40 bis te priloge (11) ali Smernica za preskušanje OECD št. 435 (12), vrednosti pH, informacije o podobnih kemikalijah ali drugi ustrezni podatki.

▼M4

NAČELO PRESKUSA

6. Preskus temelji na načelu, da se s postopnim postopkom med 4-urno izpostavljenostjo pridobi dovolj informacij o akutni strupenosti pri vdihavanju preskusne kemikalije, da je mogoče to kemikalijo razvrstiti. Za izpolnitev posebnih zakonodajnih namenov se lahko uporabijo tudi druga obdobja izpostavljenosti. V vseh točno določenih fazah koncentracij se preskusijo po 3 živali vsakega spola. Glede na smrtnost in/ali umirajoče stanje živali lahko za presojo akutne strupenosti preskusne kemikalije zadoščata 2 fazi. Če se zagotovijo dokazi, da je en spol občutljivejši od drugega, se lahko preskus nadaljuje samo z občutljivejšim spolom. Od rezultata predhodne faze je odvisna naslednja faza, na primer:

(a) nadaljnje preskušanje ni potrebno;

(b) preskušanje s tremi živalmi na spol ali

(c) preskušanje s 6 živalmi izključno občutljivejšega spola, tj. morajo ocene spodnje meje razreda strupenosti temeljiti na 6 živalih na skupino za preskusno koncentracijo, ne glede na spol.

7. Umirajoče živali ali živali, ki očitno trpijo bolečine ali kažejo znake hudega in trajnega trpljenja, je treba humano usmrtiti ter jih pri razlagi rezultatov preskusa upoštevati enako kot živali, ki so poginile med preskusom. Merila za sprejetje odločitve o usmrtitvi umirajočih živali ali živali, ki zelo trpijo, in napotki za prepoznavanje predvidljive ali neizbežne smrti so obravnavani v Dokumentu s smernicami št. 19 o humanih končnih točkah (7).

OPIS METODE

Izbira živalske vrste

8. Uporabiti je treba zdrave mlade odrasle živali običajno uporabljanih laboratorijskih sevov. Najprimernejša vrsta je podgana, uporabo drugih vrst pa je treba utemeljiti.

Priprava živali

9. Samice še niso smele kotiti in ne smejo biti breje. Na dan izpostavljenosti morajo biti živali mladi odrasli primerki, ki so stari 8 do 12 tednov, njihova teža pa ne sme odstopati za več kot ± 20 % od povprečne teže za vsak spol vseh predhodno izpostavljenih živali pri isti starosti. Živali se naključno izberejo in označijo za posamično prepoznavanje. Pred začetkom preskusa so najmanj 5 dni v kletkah, da se prilagodijo laboratorijskim razmeram. Poleg tega jih je treba pred preskušanjem krajše obdobje privajati na preskusno aparaturo, saj se tako zmanjša stres, ki ga povzroči uvedba v novo okolje.

Oskrba živali

10. Temperatura v prostoru za oskrbo preskusnih živali mora biti 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, čeprav to morda ne bo mogoče, kadar se kot nosilec uporablja voda. Pred izpostavljanjem in po njem morajo biti živali v kletkah na splošno združene v skupine po spolu in koncentraciji, pri čemer število primerkov na kletko ne sme vplivati na neovirano opazovanje posamezne živali ter mora kar najbolj zmanjšati izgube zaradi kanibalizma in spopadov. Kadar bo izpostavljen samo nos živali, jih bo morda treba privajati na zadrževalne cevi. Te živalim ne smejo povzročati prevelikega fizičnega ali toplotnega stresa ali stresa zaradi imobilizacije. Omejevanje gibanja lahko vpliva na fiziološke končne točke, kot sta telesna temperatura (hipertermija) in/ali minutni

▼M4

dihalni volumen. Če so na voljo splošni podatki, ki kažejo, da se takih sprememb ne pojavi zelo veliko, predhodno prilagajanje zadrževalnim cevem ni potrebno. Živali, ki se izpostavijo aerosolu s celim telesom, morajo biti med izpostavljenostjo nastanjene posamično, da preskusnega aerosola ne morejo filtrirati preko kožuhov drugih primerkov v kletki. Razen med izpostavljenostjo se lahko uporablja običajna in potrjena laboratorijska hrana, ki jo spremlja neomejena količina pitne vode iz komunalnega omrežja. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe/12 ur teme.

Inhalacijske komore

11. Pri izbiri inhalacijske komore je treba upoštevati lastnosti preskusne kemikalije in cilj preskusa. Po možnosti se kot način izpostavljenosti uporabi izpostavljenost nosu (imenovana tudi izpostavljenost glave ali smrčka). Izpostavljenost nosu je navadno najprimernejša za študije tekočih ali trdnih aerosolov ter za hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole. Mogoče je, da bo posebne cilje študije lažje doseči z izpostavljenostjo celega telesa, vendar je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. Kadar se uporablja komora za izpostavljenost celega telesa, skupni volumen preskusnih živali ne sme presegati 5 % prostornine komore, da se zagotovi stabilnost atmosfere. Načela tehnik izpostavljanja nosu in celega telesa ter njune posamezne prednosti in pomanjkljivosti so opisani v GD 39 (8).

POGOJI IZPOSTAVLJENOSTI

Dajanje koncentracij

12. Priporoča se, da se določi štiriurna izpostavljenost, pri čemer ta čas ne vključuje časa za vzpostavljanje ravnotežja. Za izpolnitev posebnih zahtev je lahko potrebno drugačno obdobje, vendar je treba to utemeljiti v poročilu o študiji (glej GD 39 (8)). Živali, ki so izpostavljene v komorah za izpostavljanje celega telesa, morajo biti nastanjene posamično, da se prepreči zaužitje preskusne kemikalije ob medsebojnem čiščenju primerkov v kletki. V obdobju izpostavljenosti je treba živalim odrekati hrano. Med izpostavljenostjo celega telesa lahko ves čas uživajo vodo.

13. Živali se izpostavijo preskusni kemikaliji v obliki plina, hlapov, aerosola ali njihovih zmesi. Agregatno stanje, ki bo preskušeno, je odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, izbrane koncentracije in/ali fizikalne oblike, ki bo najverjetneje prisotna med ravnanjem s preskusno kemikalijo in njeno uporabo. Higroskopne in kemično reaktivne preskusne kemikalije je treba preskušati v suhem ozračju. Paziti je treba, da se ne ustvarijo eksplozivne koncentracije.

Porazdelitev velikosti delcev

14. Za vse aerosole in hlape, ki lahko kondenzirajo v aerosole, je treba določiti velikost delcev. Da se omogoči izpostavljenost vseh ustreznih predelov dihal, so priporočeni aerosoli, katerih mediana porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) znaša 1–4 μm z geometričnim standardnim odklonom (σ_g) 1,5–3,0 (8) (13) (14). Prizadevanje za izpolnitev tega standarda naj bo razumno; če ga ni mogoče izpolniti, je treba zagotoviti strokovno presojo. Delci kovinskih hlapov so lahko na primer manjši od tega standarda, naelektreni delci, vlakna in higroskopne snovi (katerih velikost se v vlažnem okolju dihal poveča) pa lahko presegajo navedene vrednosti.

▼M4

Priprava preskusne kemikalije v nosilcu

15. Za ustvarjanje primerne koncentracije in velikosti delcev preskusne kemikalije v atmosferi se lahko uporabi nosilec. Praviloma je treba prednostno uporabiti vodo. Za snov, ki jo tvorijo delci, se lahko uporabijo mehanski postopki, da se doseže zahtevana porazdelitev velikosti delcev, vendar je treba paziti, da preskusna kemikalija ne razpade ali se spremeni. Kadar se zdi, da so mehanski postopki spremenili sestavo preskusne kemikalije (npr. ob zelo visoki temperaturi, nastali zaradi trenja pri pretiranem mletju), je treba sestavo te preskusne kemikalije analitsko preveriti. Skrbno je treba paziti, da se preskusna kemikalija ne onesnaži. Nekrušljivih granulatov, ki so namenoma formulirani tako, da jih ni mogoče vdihniti, ni treba preskušati. Uporabiti je treba preskus drobljivosti, da se dokaže, da pri ravnanju z granulatom ne nastajajo delci, ki jih je mogoče vdihniti. Če v preskusu drobljivosti nastanejo snovi, ki jih je mogoče vdihniti, je treba opraviti preskus strupenosti pri vdihavanju.

Kontrolne živali

16. Sočasna negativna kontrolna skupina (z zrakom) ni potrebna. Kadar se v pomoč pri ustvarjanju preskusne atmosfere uporablja nevodni nosilec, je treba kontrolno skupino z nosilcem uporabiti samo, če niso na voljo pretekli podatki o strupenosti pri vdihavanju. Če študija strupenosti preskusne kemikalije, formulirane v nosilcu, ne pokaže strupenosti, iz tega sledi, da nosilec pri preskušeni koncentraciji ni strupen; kontrola z nosilcem torej ni potrebna.

SPREMLJANJE POGOJEV IZPOSTAVLJENOSTI

Pretok zraka v komori

17. Pretok zraka skozi komoro je treba med vsako izpostavljenostjo skrbno nadzorovati, stalno spremljati in zabeležiti najmanj vsako uro. Spremljanje koncentracije (ali stabilnosti) preskusne atmosfere je meritev, ki je neločljivo povezana z vsemi dinamičnimi parametri in zagotavlja posredno sredstvo za nadzor nad vsemi pomembnimi dinamičnimi parametri ustvarjanja atmosfere. Pri komorah za izpostavljanje nosu je treba posebno pozornost nameniti preprečevanju ponovnega vdihavanja v primerih, v katerih pretok zraka skozi sistem izpostavljanja ni zadosten za zagotovitev dinamičnega toka atmosfere s preskusno kemikalijo. Za dokazovanje, da v izbranih pogojih postopka ne prihaja do ponovnega vdihavanja, so na voljo predpisane metodologije (8) (15). Koncentracija kisika mora znašati najmanj 19 %, koncentracija ogljikovega dioksida pa ne sme presegati 1 %. Če obstajajo razlogi za mnenje, da teh standardov ni mogoče izpolniti, je treba koncentraciji kisika in ogljikovega dioksida izmeriti.

Temperatura in relativna vlažnost v komori

18. Temperaturo v komori je treba ohranjati pri 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost v območju dihanja živali je treba pri izpostavljenosti nosu in izpostavljenosti celega telesa spremljati ter jo zabeležiti najmanj trikrat, če izpostavljenost traja do 4 ure, medtem ko se pri krajših časih izpostavljenosti ta meritev zabeleži vsako uro. Relativno vlažnost je treba po možnosti ohranjati v območju 30–70 %, vendar je to lahko bodisi nedosegljivo (npr. pri preskušanju zmesi na vodni osnovi) bodisi neizmerljivo zaradi interference preskusne kemikalije s preskusno metodo.

▼M4

Preskusna kemikalija: nazivna koncentracija

19. Vedno, kadar je to izvedljivo, je treba izračunati in zabeležiti nazivno koncentracijo v komori za izpostavljanje. Nazivna koncentracija je masa ustvarjene preskusne kemikalije, deljena s skupnim volumnom zraka, ki preide skozi sistem komore. Nazivna koncentracija se ne uporablja za opredeljevanje izpostavljenosti živali, pač pa pri primerjavi z dejansko koncentracijo pokaže, kako učinkovito je ustvarjanje preskusnega sistema, in se torej lahko uporabi za odkrivanje težav pri tem ustvarjanju.

Preskusna kemikalija: dejanska koncentracija

20. Dejanska koncentracija je koncentracija preskusne kemikalije v območju dihanja živali v inhalacijski komori. Meri se s specifičnimi metodami (npr. z neposrednim vzorčenjem, adsorpcijskimi ali kemičnimi reaktivnimi metodami in naknadnim analitskim opredeljevanjem) ali nespecifičnimi metodami, kot je gravimetrična analiza s filtriranjem. Uporaba gravimetrične analize je sprejemljiva samo za enokomponentne prašne aerosole ali aerosole tekočin z majhno hlapnostjo ter jo je treba pred študijo podpreti z ustreznimi opredelitvami, specifičnimi za preskusno kemikalijo. Z gravimetrično analizo se lahko določi tudi koncentracija večkomponentnega prašnega aerosola, vendar so za to potrebni analitski podatki, ki kažejo, da je sestava snovi v zraku podobna začetni snovi. Če te informacije niso na voljo, bo morda treba med študijo znova analizirati preskusno kemikalijo (po možnosti takrat, ko lebdi v zraku) v rednih intervalih. Za aerosolizirane snovi, ki lahko izhlapijo ali sublimirajo, je treba prikazati, da so bile vse faze zbrane z izbrano metodo. V poročilu o študiji je treba navesti ciljne, nazivne in dejanske koncentracije, vendar se v statističnih analizah za izračun vrednosti smrtnih koncentracij uporabljajo samo dejanske koncentracije.

21. Po možnosti je treba uporabiti eno serijo preskusne kemikalije, preskusni vzorec pa je treba hraniti v pogojih, v katerih se ohranjajo njegova čistost, homogenost in stabilnost. Pred začetkom študije je treba opredeliti lastnosti preskusne kemikalije, vključno z njeno čistostjo ter, če je to tehnično izvedljivo, identiteto in količinami ugotovljenih kontaminantov in nečistot. To se lahko med drugim prikaže z naslednjimi podatki: z retencijskim časom in relativno površino vrha, molekulsko maso, ugotovljeno na podlagi analiz z masno spektroskopijo ali plinsko kromatografijo, ali z drugimi ocenami. Čeprav identiteta preskusnega vzorca ni odgovornost preskuševalnega laboratorija, je morda smotrno, da ta vsaj deloma potrdi naročnikovo opredelitev lastnosti (npr. barvo, agregatno stanje itd.).

22. Atmosfera v komori za izpostavljanje naj bo konstantna, kolikor je to izvedljivo, ter naj se glede na analitsko metodo spremlja stalno in/ali v rednih intervalih. Kadar se uporablja vzorčenje v intervalih, je treba v štiriurni študiji vzorce atmosfere v komori vzeti najmanj dvakrat. Če to zaradi omejenih stopenj pretoka zraka ali nizkih koncentracij ni izvedljivo, se lahko v celotnem obdobju izpostavljenosti vzame en vzorec. Če se med posameznimi vzorci pojavijo izrazita nihanja, je treba pri preskušanju naslednjih koncentracij uporabiti štiri vzorce na izpostavljenost. Posamezni vzorci koncentracije v komori od srednje koncentracije ne smejo odstopati za več kot ± 10 % za pline in hlape oziroma za več kot ± 20 % za tekoče ali trdne aerosole. Izračunati in zabeležiti je treba čas do vzpostavitve ravnotežja v komori (t_{95}). Čas izpostavljenosti pokriva čas ustvarjanja preskusne kemikalije, pri tem pa je upoštevan čas, potreben za dosego t_{95}. Napotki za ocenjevanje t_{95} so na voljo v GD 39 (8).

▼M4

23. Pri zelo kompleksnih zmeseh, sestavljenih iz hlapov/plinov in aerosolov (npr. zgorevalnih atmosfer in preskusnih kemikalij, potiskanih iz namenskih proizvodov/naprav za posebno uporabo), se lahko v inhalacijski komori vsaka faza obnaša drugače, zato je treba za vsako fazo (hlape/plin in aerosol) izbrati najmanj eno indikatorsko snov (analit), ki je navadno glavna aktivna snov v zmesi. Kadar je preskusna kemikalija zmes, je treba analitsko koncentracijo navesti za celotno zmes in ne le za aktivno snov ali sestavino (analit). Dodatne informacije o dejanskih koncentracijah so na voljo v GD 39 (8).

Preskusna kemikalija: porazdelitev velikosti delcev

24. Porazdelitev velikosti delcev aerosolov je treba med vsako 4-urno izpostavljenostjo določiti vsaj dvakrat s kaskadnim impaktorjem ali nadomestnim instrumentom, kot je aerodinamični merilnik delcev. Če je mogoče prikazati enakovrednost rezultatov, dobljenih s kaskadnim impaktorjem in nadomestnim instrumentom, se lahko nadomestni instrument uporablja skozi celotno študijo. Vzporedno s primarnim instrumentom je treba za potrditev njegove učinkovitosti zbiranja uporabljati še drugo napravo, kot je gravimetrični filter ali (plinska) izpiralka. Masna koncentracija, dobljena z analizo velikosti delcev, mora biti v razumnih mejah masne koncentracije, dobljene z analizo s filtriranjem (glej GD 39 (8)). Če je enakovrednost mogoče prikazati zgodaj v študiji, se lahko nadaljnje potrditvene meritve opustijo. Zaradi dobrobiti živali je treba sprejeti ukrepe, da se čim bolj zmanjša količina pomanjkljivih podatkov, zaradi katerih bi bilo treba izpostavljanje ponoviti. Za hlape je treba velikost delcev določiti, če obstaja možnost, da se bodo hlapi kondenzirali v aerosol, ali če se v atmosferi s hlapi, v kateri so mogoče mešane faze, zaznajo delci (glej odstavek 14).

POSTOPEK

Glavni preskus

25. V vsaki fazi se uporabijo tri živali na spol ali šest živali občutljivejšega spola. Če se z nosom izpostavijo vrste glodavcev, ki niso podgane, se lahko najdaljša obdobja izpostavljenosti prilagodijo, da se kar najbolj zmanjša trpljenje, značilno za uporabljeno vrsto. Koncentracija, ki bo uporabljena kot začetni odmerek, se izbere med štirimi točno določenimi koncentracijami, začetna koncentracija pa mora biti tista, ki bo najverjetneje povzročila zastrupitev pri nekaterih od živali, ki bodo prejele odmerek. Sheme preskušanja za pline, hlape in aerosole (vključene v dodatke 2–4) ponazarjajo preskušanje z mejnimi vrednostmi kategorij 1–4 iz Uredbe (ES) št. 1272/2008 (9) za pline (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (Dodatek 2), hlape (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (Dodatek 3) in aerosole (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (Dodatek 4). Kategorija 5, ki se v navedeni uredbi ne izvaja, se nanaša na koncentracije nad zadevnimi mejnimi koncentracijami. Za vsako začetno koncentracijo se uporablja zadevna shema preskušanja. Glede na število humano usmrčenih ali poginulih živali se v preskusnem postopku sledi prikazanim puščicam, dokler ni mogoča razvrstitev v kategorijo.

26. Časovni interval med skupinami za izpostavljanje je določen glede na nastop, trajanje in resnost strupenih znakov. Z izpostavljanjem živali naslednji stopnji koncentracije je treba počakati, dokler ni mogoče z razumno gotovostjo sklepati o preživetju predhodno preskušenih živali. Med izpostavljanji naslednji stopnji koncentracije je priporočljivo počakati tri ali štiri dni, da se omogoči opazovanje zapoznele strupenosti. Časovni interval se lahko ustrezno prilagodi, npr. pri neopredeljivih odzivih.

▼M4

Mejni preskus

27. Mejni preskus se uporabi, kadar je znano ali se pričakuje, da je preskusna kemikalija praktično nestrupena, tj. da povzroči toksično reakcijo samo nad zakonsko predpisano mejno koncentracijo. Informacije o strupenosti preskusne kemikalije se lahko pridobijo na podlagi znanja o podobnih preskušenih snoveh ali podobnih zmeseh ob upoštevanju identitete in odstotka sestavin, za katere je znano, da so toksikološko pomembne. Kadar je informacij o strupenosti preskusne kemikalije malo oziroma jih ni ali kadar se pričakuje, da je strupena, je treba opraviti glavni preskus (več napotkov je na voljo v GD 39 (8)).

28. Z običajnim postopkom se tri živali na spol ali šest živali občutljivejšega spola izpostavi koncentraciji 20 000 ppm za pline, 20 mg/l za hlape oziroma 5 mg/l za prah/meglice (če so te koncentracije dosegljive), kar se uporabi kot mejni preskus za to preskusno metodo. Pri preskušanju aerosolov mora biti glavni cilj ustvariti delce takšne velikosti, da jih je mogoče vdihniti (tj. MMAD 1–4 μm). To je mogoče z večino preskusnih kemikalij pri koncentraciji 2 mg/l. Preskušanje aerosolov pri koncentracijah, višjih od 2 mg/l, se lahko izvaja samo, če se lahko zagotovi delce takšne velikosti, da jih je mogoče vdihniti (glej GD 39 (8)). V skladu z globalno usklajenim sistemom za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS) (16) se zaradi dobrobiti živali preskušanje nad mejno koncentracijo odsvetuje. Preskušanje v kategoriji 5 v skladu z GHS (16), ki se v Uredbi (ES) št. 1272/2008 (9) ne izvaja, se sme predvideti samo, kadar obstaja velika verjetnost, da bodo rezultati takega preskusa neposredno pomembni za varovanje zdravja ljudi, poleg tega pa je treba to utemeljiti v poročilu o študiji. V primeru potencialno eksplozivnih preskusnih kemikalij je treba paziti, da se ne ustvarijo ugodni pogoji za eksplozijo. Zaradi izogibanja nepotrebni uporabi živali je treba pred mejnim preskusom opraviti preskus brez živali in tako zagotoviti, da je v komori mogoče doseči pogoje za mejni preskus.

OPAZOVANJA

29. Med obdobjem izpostavljenosti je treba živali pogosto klinično opazovati. Po izpostavljenosti je treba klinična opazovanja izvajati skupno 14 dni, in sicer na dan izpostavljenosti najmanj dvakrat ali pogosteje, če to nakazuje odziv živali na tretiranje, nato pa najmanj enkrat na dan. Dolžina obdobja opazovanja ni točno določena, pač pa jo je treba določiti glede na naravo in čas nastopa kliničnih znakov ter dolžino obdobja okrevanja. Časi pojava in izginotja pokazateljev strupenosti so pomembni, zlasti če se ti znaki nagibajo k zapoznelosti. Vsa opažanja se sistematično zabeležijo, pri čemer se evidence vodijo za vsako žival posebej. Umirajoče živali ter živali, ki kažejo znake hude bolečine in/ali trajnega in hudega trpljenja, je treba zaradi njihove dobrobiti humano usmrtiti. Pri pregledih za kliničnimi pokazatelji strupenosti je treba paziti, da se začetni slab videz in prehodne spremembe v dihanju, ki so posledica postopka izpostavljanja, ne zamenjajo za učinke, povezane s tretiranjem. Upoštevati je treba načela in merila, povzeta v Dokumentu s smernicami o humanih končnih točkah (7). Kadar se živali usmrtijo iz humanih razlogov ali so najdene poginule, je treba čas smrti zabeležiti čim natančneje.

▼M4

30. Opazovanja v kletkah morajo vključevati spremembe na koži in kožuhu, očeh in sluznicah, v dihalih, obtočilih, avtonomnem in osrednjem živčevju ter pri somatomotoričnih aktivnostih in vedenjskih vzorcih. Kadar je to mogoče, je treba zabeležiti vsa razlikovanja med lokalnimi in sistemskimi učinki. Pozorno je treba opazovati tremorje, krče, slinjenje, drisko, letargijo, spanje in komo. Z merjenjem rektalne temperature se lahko pridobijo podporni dokazi o refleksni bradipneji ali hipo-/hipertermiji, povezani s tretiranjem ali konfinacijo.

Telesna teža

31. Težo posameznih živali je treba zabeležiti enkrat v obdobju prilagajanja na okolje, na dan izpostavljenosti pred izpostavljenostjo (dan 0) ter vsaj 1., 3. in 7. dan (nato pa tedensko), poleg tega pa še ob poginu ali evtanaziji, če ta nastopi po 1. dnevu. Telesna teža se priznava kot bistveni kazalnik strupenosti, tako da je treba živali, pri katerih se v primerjavi z vrednostmi pred študijo opazi trajen upad za ≥ 20 %, skrbno spremljati. Preživele živali se ob koncu obdobja po izpostavljenosti stehtajo in humano usmrtijo.

Patologija

32. Na vseh preskusnih živalih, vključno s tistimi, ki med preskusom poginejo ali so evtanazirane in odstranjene iz študije zaradi njihove dobrobiti, je treba opraviti makroskopsko obdukcijo. Če je ni mogoče opraviti takoj po odkritju poginule živali, je treba žival ohladiti (ne zamrzniti) na dovolj nizko temperaturo, da se avtoliza čim bolj zmanjša. Obdukcijo je treba opraviti čim prej, navadno v dnevu ali dveh. Za vsako žival je treba zabeležiti vse makroskopske patološke spremembe s posebnim poudarkom na spremembah dihal.

33. Za razširitev razlagalne vrednosti študije se lahko razmisli o dodatnih samoumevno vključenih pregledih, kot sta tehtanje pljuč preživelih podgan in/ali zagotavljanje dokazov o dražilnosti z mikroskopskim pregledom dihal. Med pregledanimi organi so lahko tudi tisti, ki kažejo makroskopske patološke znake pri živalih, ki so preživele 24 ur ali več, in organi, za katere je znano ali se pričakuje, da so prizadeti. Mikroskopski pregled celotnih dihal lahko zagotovi koristne informacije za preskusne kemikalije, ki reagirajo z vodo, kot so kisline in higroskopne preskusne kemikalije.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Zagotoviti je treba podatke o telesni teži in ugotovitvah obdukcije posameznih živali. Podatke o kliničnih opazovanjih je treba povzeti v preglednicah, v katerih se za vsako preskusno skupino navedejo število uporabljenih živali, število živali, ki kažejo specifične znake zastrupitve, število živali, ki so bile najdene poginule med preskusom ali usmrčene iz humanih razlogov, čas smrti posameznih živali, opis in časovni potek strupenih učinkov in reverzibilnosti ter ugotovitve obdukcije.

▼M4

Poročilo o preskusu

35. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije, kot je primerno:

Preskusne živali in oskrba

— opis pogojev v kletkah, vključno s številom (ali spremembo števila) živali na kletko, nastiljem, temperaturo prostora in relativno vlažnostjo, fotoperiodo ter opredelitvijo hrane,

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev uporabe vrste, ki ni podgana,

— število, starost in spol živali,

— metodo randomizacije,

— podatke o kakovosti hrane in vode (vključno z vrsto/virom hrane in virom vode),

— opis morebitne priprave živali pred preskusom, vključno s hrano, karanteno in zdravljenjem.

Preskusna kemikalija

— agregatno stanje, čistost in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (vključno z izomerizacijo),

— identifikacijske podatke in registrsko številko Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), če je znana.

Nosilec

— utemeljitev uporabe nosilca in utemeljitev izbire nosilca (če to ni voda),

— pretekle ali tekoče podatke, ki dokazujejo, da nosilec ne vpliva na rezultat študije.

Inhalacijska komora

— opis inhalacijske komore, vključno z merami in prostornino,

— izvor in opis opreme, uporabljene za izpostavljanje živali in ustvarjanje atmosfere,

— opremo za merjenje temperature, vlažnosti, velikosti delcev in dejanske koncentracije,

— vir zraka, obdelavo dovajanega/odvajanega zraka in sistem za klimatiziranje,

— metode, uporabljene za umerjanje opreme za zagotavljanje homogene preskusne atmosfere,

— razliko v tlaku (pozitivna ali negativna),

— izpostavitvene odprtine na komoro (izpostavljanje nosu); položaj živali v sistemu (izpostavljanje celega telesa),

— časovno homogenost/stabilnost preskusne atmosfere,

— položaj tipal za zaznavanje temperature in vlažnosti ter mesto vzorčenja preskusne atmosfere v komori,

— stopnje pretoka zraka, stopnjo pretoka zraka/izpostavitveno odprtino (izpostavljanje nosu) ali število živali/komoro (izpostavljanje celega telesa),

— informacije o opremi, uporabljeni za merjenje kisika in ogljikovega dioksida, če je ustrezno,

▼M4

— čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja v inhalacijski komori (t_{95}),

— število zamenjav volumnov zraka na uro,

— merilne naprave (če je ustrezno).

Podatki o izpostavljenosti

— utemeljitev izbire ciljne koncentracije v glavni študiji,

— nazivne koncentracije (skupna masa ustvarjene preskusne kemikalije v inhalacijski komori, deljena z volumnom zraka, ki preide skozi komoro),

— dejanske koncentracije preskusne kemikalije, ki se vzamejo v območju dihanja živali; za preskusne zmesi, pri katerih nastajajo heterogene fizikalne oblike (plini, hlapi, aerosoli), se lahko vsaka analizira ločeno,

— vse koncentracije v zraku je treba navesti v masnih enotah (npr. mg/l, mg/m^3 itd.); v oklepajih se lahko navedejo tudi prostorninske enote (npr. ppm, ppb),

— porazdelitev velikosti delcev, mediano porazdelitvene mase delcev v zraku glede na aerodinamični premer (MMAD) in geometrični standardni odklon (σg), vključno z metodami za njihov izračun. Poročati je treba o posameznih analizah velikosti delcev.

Preskusni pogoji

— podatke o pripravi preskusne kemikalije, vključno s podrobnostmi o postopkih, uporabljenih za zmanjšanje velikosti delcev trdnih snovi ali pripravo raztopin preskusne kemikalije. Kadar obstaja možnost, da so mehanski postopki spremenili sestavo preskusne kemikalije, je treba vključiti rezultate analiz za preverjanje sestave te preskusne kemikalije,

— opis (ki po možnosti vključuje diagram) opreme, uporabljene za ustvarjanje preskusne atmosfere in izpostavljanje živali preskusni atmosferi,

— podatke o uporabljeni kemijski analitski metodi in njeni validaciji (vključno z rekuperacijo preskusne kemikalije iz nosilca za vzorčenje),

— utemeljitev določitve preskusnih koncentracij.

Rezultati

— preglednice o temperaturi, vlažnosti in pretoku zraka v komori,

— preglednice s podatki o nazivnih in dejanskih koncentracijah,

— preglednice s podatki o velikosti delcev, vključno s podatki o analitskem vzorčenju, porazdelitvijo velikosti delcev ter izračuni MMAD in σ_g,

— preglednice s podatki o odzivu in koncentracijah za vsako žival (tj. za živali, ki kažejo znake strupenosti, vključno s smrtnostjo ter naravo, resnostjo in trajanjem učinkov),

— telesne teže posameznih živali, izmerjene med študijo, datum in čas smrti, če je ta nastopila pred predvideno evtanazijo; časovni potek nastopa znakov zastrupitve in ali so bili ti reverzibilni za vsako žival,

▼M4

— izsledke obdukcije in histopatološke preiskave za vsako žival, če so na voljo,

— razvrstitev kategorij po Uredbi (ES) št. 1272/2008 in mejno vrednost LC_{50}.

Razprava in razlaga rezultatov

— poseben poudarek je treba nameniti opisu metod, uporabljenih za izpolnitev meril te preskusne metode, npr. glede mejne koncentracije ali velikosti delcev,

— z vidika splošnih ugotovitev je treba obravnavati možnost vdihavanja delcev, zlasti če meril glede velikosti delcev ni bilo mogoče izpolniti,

— v splošno oceno študije je treba vključiti doslednost metod, uporabljenih za določanje nazivne in dejanske koncentracije, ter razmerje med njima,

— obravnavati je treba verjetni vzrok smrti in prevladujoči način delovanja (sistemski ali lokalni),

— če je bilo treba na podlagi meril iz Dokumenta s smernicami OECD o humanih končnih točkah (7) humano žrtvovati živali, ki so trpele bolečine ali kazale znake hudega in trajnega trpljenja, je treba to pojasniti.

VIRI:

(1) Poglavje B.2 te priloge, Akutna strupenost pri vdihavanju.

(2) Holzhütter, H.-G., Genschow, E., Diener, W., in Schlede, E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243–254.

(3) Diener, W., Kayser, D., in Schlede, E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537–549.

(4) Diener, W., in Schlede, E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 1: 129–134.

(5) Poglavje B.1 tris te priloge, Akutna oralna toksičnost – metoda razredov akutne toksičnosti.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼**M4**

(10) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskus transkutane električne upornosti (TER).

(11) Poglavje B.40 bis te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskus z modelom človeške kože.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(13) Phalen, R. F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2. izdaja) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

(15) Pauluhn, J., in Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

(16) OZN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, OZN New York in Ženeva. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html.

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

Dodatek 2

Postopek, ki ga je treba upoštevati pri vsaki začetni koncentraciji za pline (ppM/4 H)

Splošne opombe ([1])

Za vsako začetno koncentracijo je v zadevnih shemah preskušanja, vključenih v ta dodatek, prikazan postopek, ki ga je treba upoštevati.

Dodatek 2a: začetna koncentracija je 100 ppm

Dodatek 2b: začetna koncentracija je 500 ppm

Dodatek 2c: začetna koncentracija je 2 500 ppm

Dodatek 2d: začetna koncentracija je 20 000 ppm

Glede na število humano usmrčenih ali poginulih živali se v preskusnem postopku sledi prikazanim puščicam.

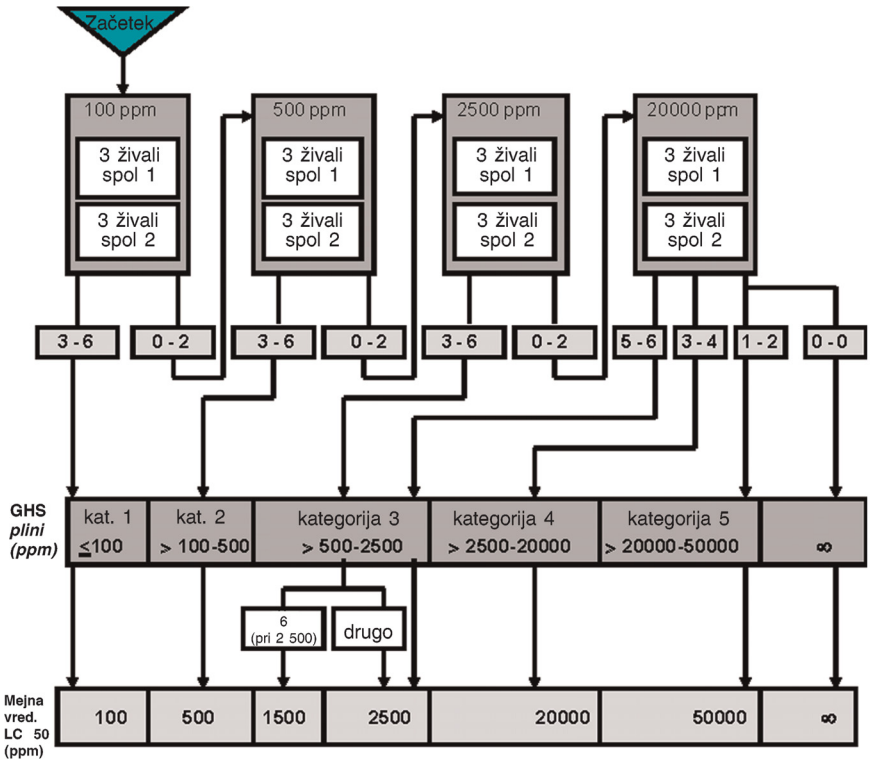
([1]) Spodnje preglednice vsebujejo sklicevanja na globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). V EU se enakovreden sistem izvaja z Uredbo (ES) št. 1272/2008. V primeru akutne strupenosti pri vdihavanju se z Uredbo (ES) št. 1272/2008 (9) ne izvaja kategorija 5.

▼M4

Dodatek 2a

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 100 ppm/4 h za pline



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

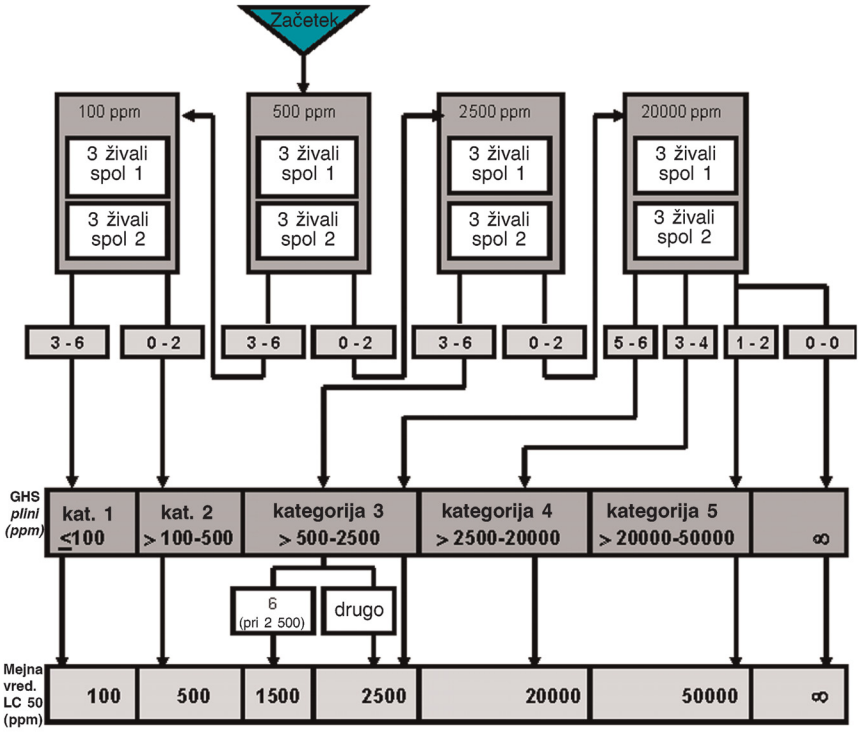
— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 2b

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 500 ppm/4 h za pline



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

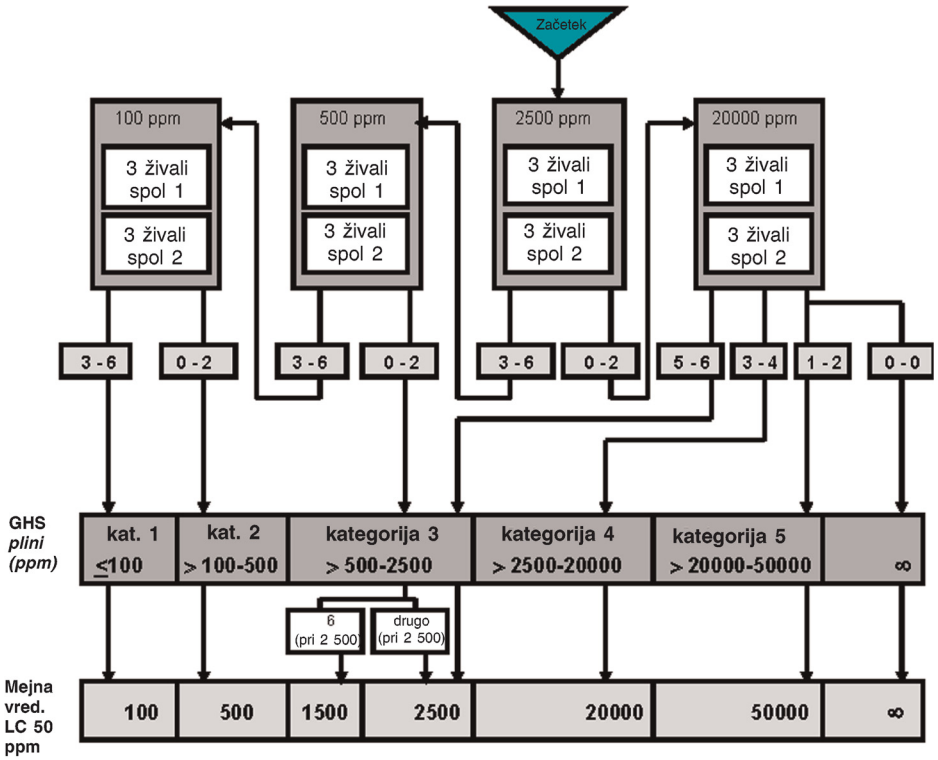
— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 2c

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 2 500 ppm/4 h za pline



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0–6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

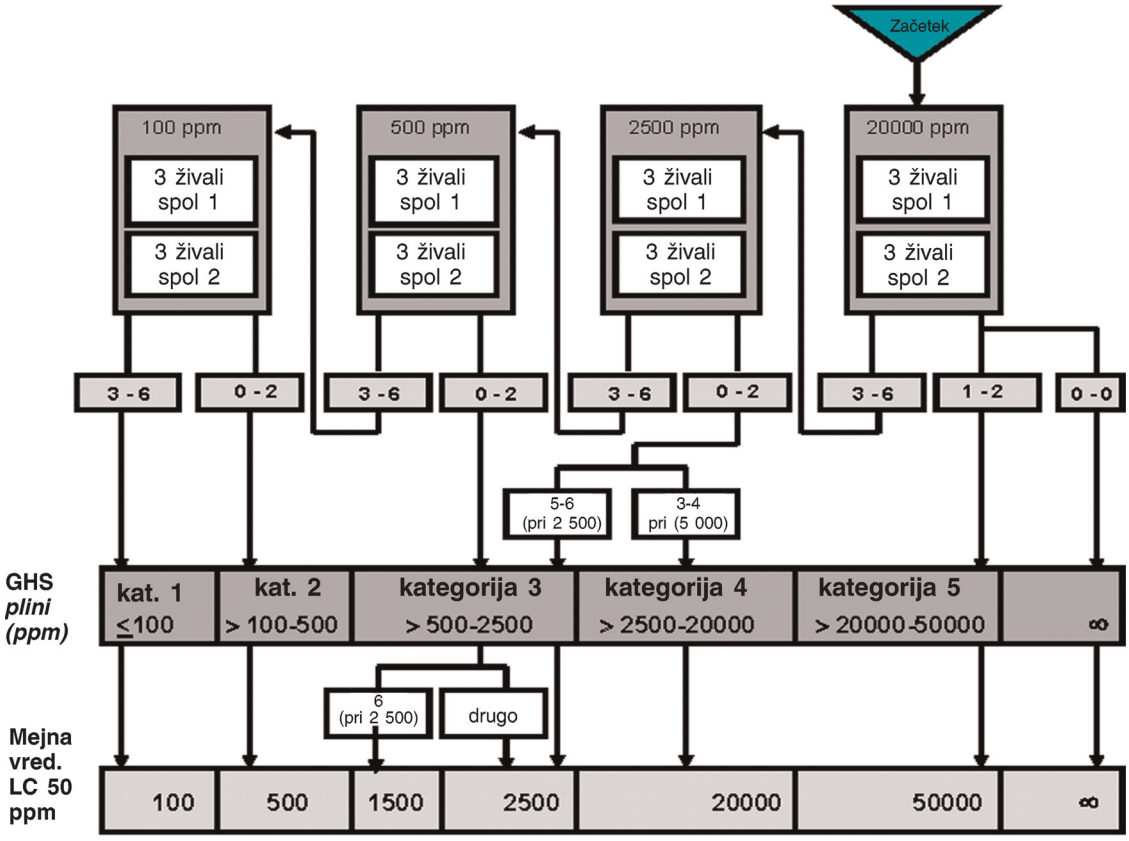
— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 2d

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 20 000 ppm/4 h za pline



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼**M4**

Dodatek 3

Postopek, ki ga je treba upoštevati pri vsaki začetni koncentraciji za hlape (mg/L/4 H)

Splošne opombe ([1])

Za vsako začetno koncentracijo je v zadevnih shemah preskušanja, vključenih v ta dodatek, prikazan postopek, ki ga je treba upoštevati.

Dodatek 3a: začetna koncentracija je 0,5 mg/l

Dodatek 3b: začetna koncentracija je 2,0 mg/l

Dodatek 3c: začetna koncentracija je 10 mg/l

Dodatek 3d: začetna koncentracija je 20 mg/l

Glede na število humano usmrčenih ali poginulih živali se v preskusnem postopku sledi prikazanim puščicam.

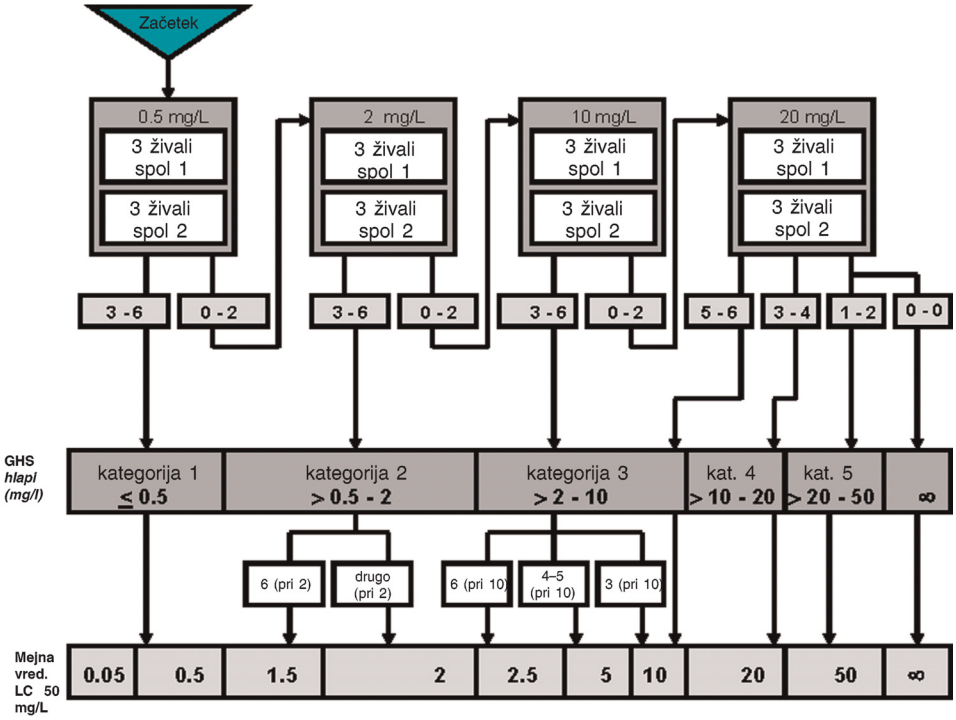
([1]) Spodnje preglednice vsebujejo sklicevanja na globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). V EU se enakovreden sistem izvaja z Uredbo (ES) št. 1272/2008. V primeru akutne strupenosti pri vdihavanju se z Uredbo (ES) št. 1272/2008 (9) ne izvaja kategorija 5.

▼M4

Dodatek 3a

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 0,5 mg/L/4 h za hlape



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

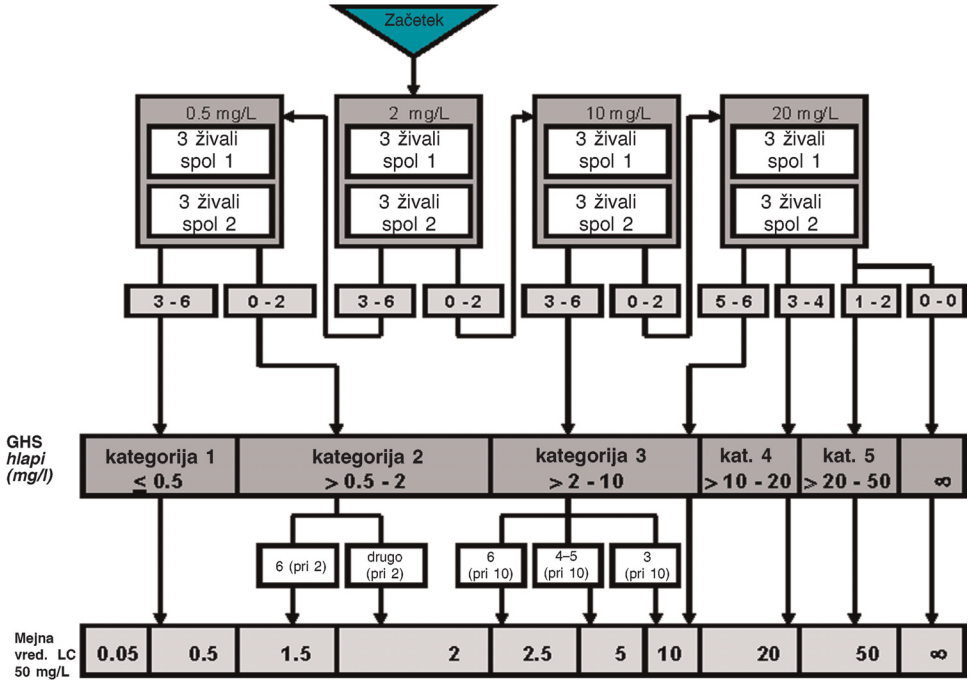
— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 3b

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 2 mg/L/4 h za hlape



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0–6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

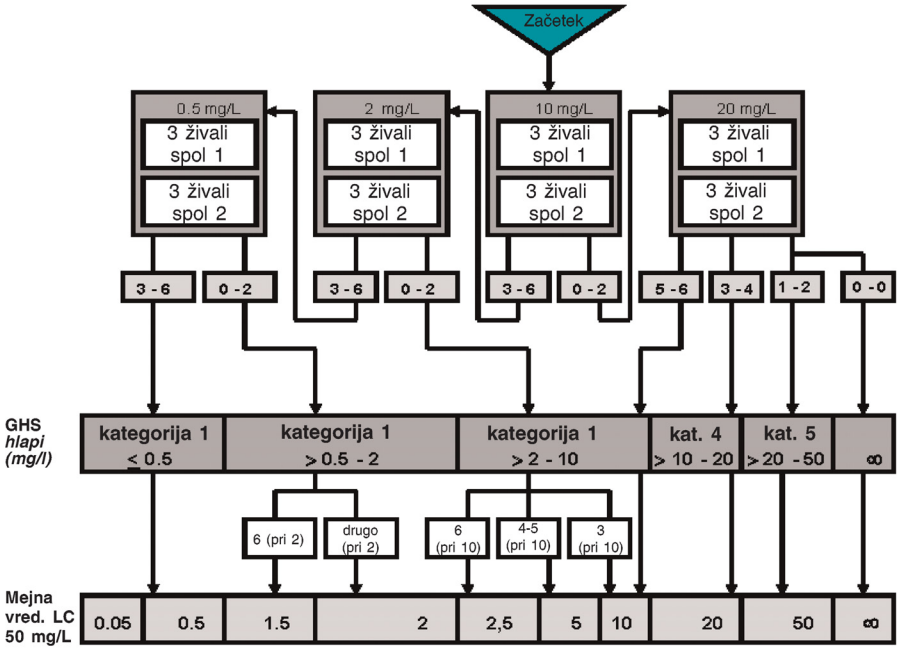
— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 3c

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentraci jo 10 mg/L/4 h za hlape



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0–6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

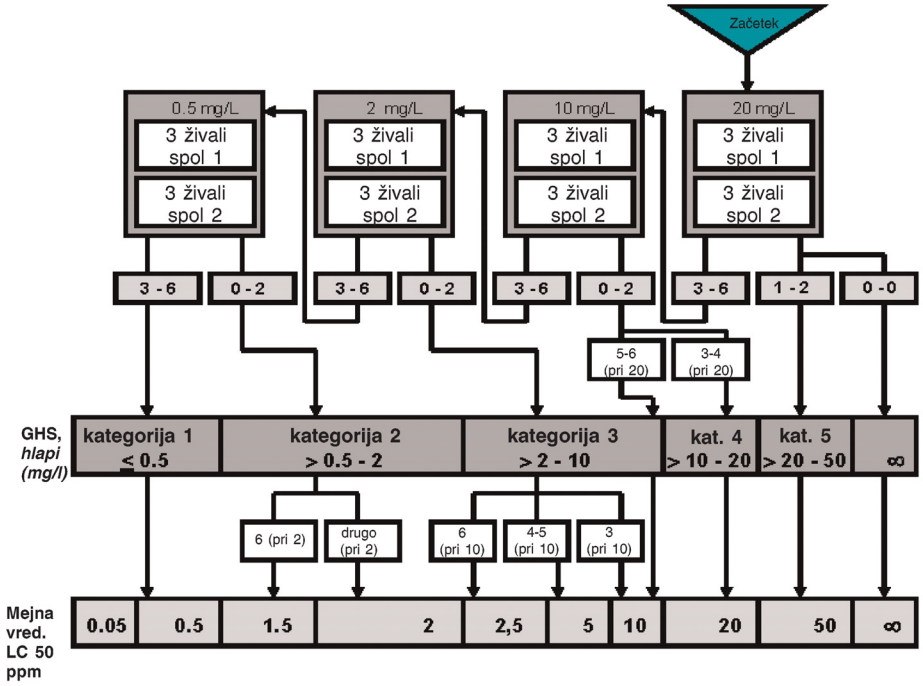
— preskušanje pri ≥ 20 000 ppm/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 3d

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 20 mg/L/4 h za hlape



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola

— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo

— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje

— ∞: nerazvrščeno

— preskušanje pri 50 mg/L/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 4

Postopek, ki ga je treba upoštevati pri vsaki začetni koncentraciji za aerosole (mg/L/4 H)

Splošne opombe ([1])

Za vsako začetno koncentracijo je v zadevnih shemah preskušanja, vključenih v ta dodatek, prikazan postopek, ki ga je treba upoštevati.

Dodatek 4a: začetna koncentracija je 0,05 mg/l

Dodatek 4b: začetna koncentracija je 0,5 mg/l

Dodatek 4c: začetna koncentracija je 1 mg/l

Dodatek 4d: začetna koncentracija je 5 mg/l

Glede na število humano usmrčenih ali poginulih živali se v preskusnem postopku sledi prikazanim puščicam.

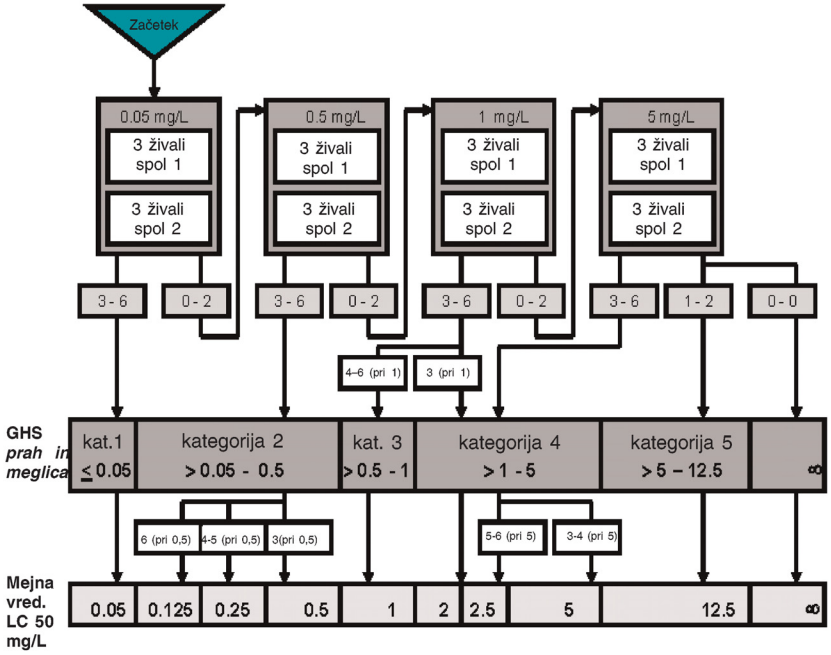
([1]) Spodnje preglednice vsebujejo sklicevanja na globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). V EU se enakovreden sistem izvaja z Uredbo (ES) št. 1272/2008. V primeru akutne strupenosti pri vdihavanju se z Uredbo (ES) št. 1272/2008 (9) ne izvaja kategorija 5.

▼M4

Dodatek 4a

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentraci jo 0,05 mg/L/4 h za aerosole



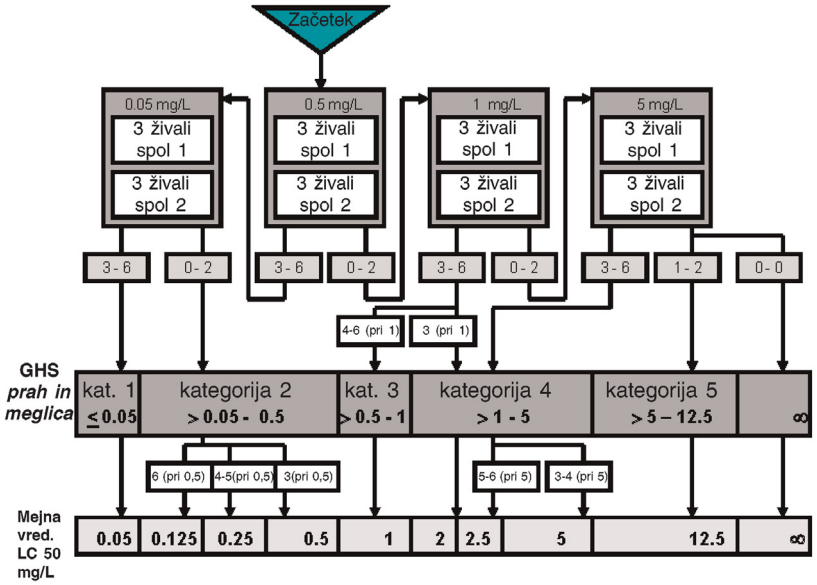
— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola
— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo
— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje
— ∞: nerazvrščeno
— preskušanje pri 50 mg/L/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 4b

Akutna strupenost privdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 0,5 mg/L/4 h za aerosole



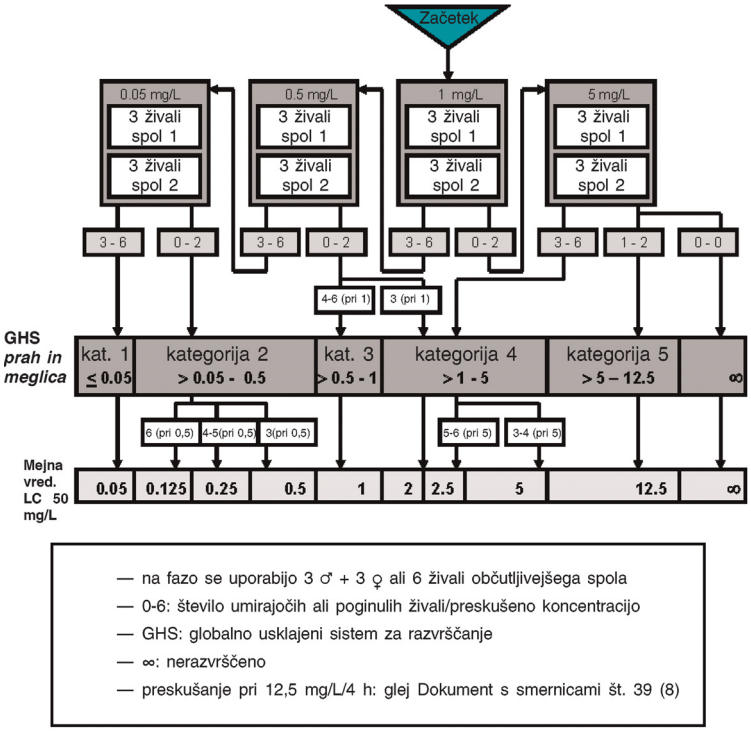
— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola
— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo
— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje
— ∞: nerazvrščeno
— preskušanje pri 12,5 mg/L/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 4c

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 1 mg/L/4 h za aerosole



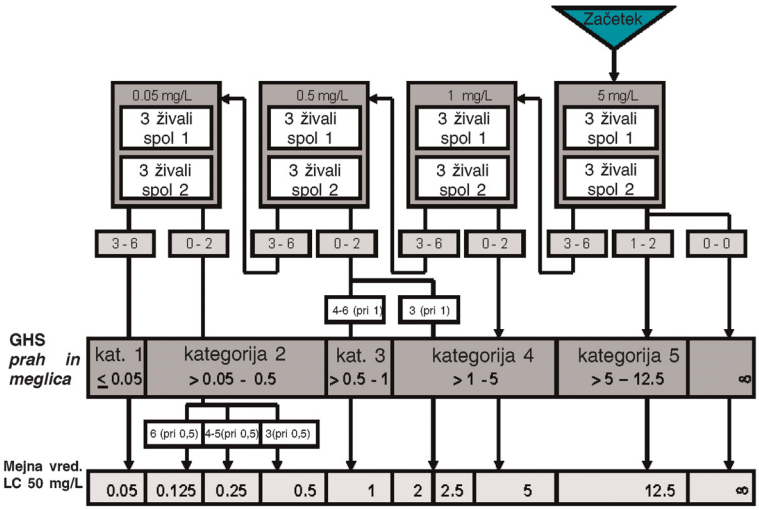
— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola
— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo
— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje
— ∞: nerazvrščeno
— preskušanje pri 12,5 mg/L/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)

▼M4

Dodatek 4d

Akutna strupenost pri vdihavanju:

preskusni postopek z začetno koncentracijo 5 mg/L/4 h za aerosole



— na fazo se uporabijo 3 ♂ + 3 ♀ ali 6 živali občutljivejšega spola
— 0-6: število umirajočih ali poginulih živali/preskušeno koncentracijo
— GHS: globalno usklajeni sistem za razvrščanje
— ∞: nerazvrščeno
— preskušanje pri 12,5 mg/L/4 h: glej Dokument s smernicami št. 39 (8)“

▼M5

B.53 ŠTUDIJA RAZVOJNE NEVROTOKSIČNOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) št. 426 (2007). Delovna skupina OECD za strupenost za razmnoževanje in razvoj je junija 1995 v Københavnu obravnavala potrebo po posodobitvi obstoječih smernic za preskušanje OECD za strupenost za razmnoževanje in razvoj ter pripravo novih smernic za končne točke, ki še niso zajete (1). Delovna skupina je priporočila, da bi bilo treba smernico za preskušanje v zvezi z razvojno nevrotoksičnostjo pripraviti na podlagi smernice ameriške agencije EPA, ki je bila tudi že revidirana (2). Junija 1996 je v Københavnu potekalo drugo posvetovalno zasedanje, da bi se sekretariatu predložili napotki za pripravo nove smernice za preskušanje v zvezi s strupenostjo za razvoj, vključno s pomembnimi dejavniki, npr. podrobnostmi o izbiri živalskih vrst, obdobjem odmerjanja, preskusnim obdobjem, končnimi točkami, ki jih je treba oceniti, in merili za vrednotenje rezultatov. Leta 1998 je bila objavljena ameriška smernica za oceno tveganja nevrotoksičnosti (3). Oktobra 2000 sta drug za drugim potekala strokovno posvetovalno zasedanje OECD in delavnica Inštituta za tvegano znanost ILSI, leta 2005 pa je bilo v Tokiu organizirano strokovno posvetovalno zasedanje. Namen teh srečanj je bila obravnava znanstvenih in tehničnih vprašanj, povezanih z obstoječo smernico za preskušanje, priporočila z zasedanj (4) (5) (6) (7) pa so se upoštevala pri pripravi te testne metode. Dodatne informacije o izvedbi, interpretaciji in terminologiji, uporabljeni za to preskusno metodo, so navedene v smernicah OECD št. 43 „Reproductive Toxicity Testing and Assessment“ (8) in št. 20 „Neurotoxicity Testing“ (9).

ZAČETNI PREUDARKI

2. Znano je, da številne kemikalije povzročajo razvojne nevrotoksične učinke pri človeku in drugih vrstah (10) (11) (12) (13). Za oceno in vrednotenje strupenih lastnosti kemikalije je lahko potrebna določitev možnosti za razvojno nevrotoksičnost. Študije razvojne nevrotoksičnosti so namenjene zagotavljanju podatkov o možnih funkcionalnih in morfoloških učinkih na razvijajoči se živčni sistem potomca, ki lahko nastanejo zaradi izpostavljenosti v maternici in zgodnjem življenjskem obdobju, vključno z opredelitvami odziva na odmerek.

3. Študija razvojne nevrotoksičnosti se lahko izvede kot ločena študija, lahko je vključena v študijo strupenosti za razmnoževanje in/ali nevrotoksičnosti pri odraslih (npr. preskusne metode B.34 (14), B.35 (15) in B.43 (16)) ali dodana študiji strupenosti za predrojstveni razvoj (npr. preskusna metoda B.31 (17)). Če je študija razvojne nevrotoksičnosti vključena v drugo študijo ali ji je dodana, je treba ohraniti celovitost obeh vrst študij. Vsi preskusi morajo biti v skladu z veljavno zakonodajo ali vladnimi in institucionalnimi smernicami za uporabo laboratorijskih živali v raziskavi (npr. 18).

4. Preskuševalni laboratorij mora pred začetkom izvajanja študije preučiti vse razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji. Takšne informacije vključujejo vrsto in strukturo kemikalije, njene fizikalno-kemijske lastnosti, rezultate katerih koli drugih preskusov strupenosti kemikalije *in vitro* ali *in vivo*, toksikološke podatke o strukturno sorodnih kemikalijah in pričakovane uporabe kemikalije. Te informacije so potrebne, da se vsem, ki jih to zadeva, zagotovi, da je preskus pomemben za zaščito zdravja ljudi in da bo v pomoč pri izbiri ustreznega začetnega odmerka.

▼M5

NAČELO PRESKUSA

5. Preskusna kemikalija se živalim daje med brejostjo in laktacijo. Matere se preskušajo za oceno učinkov na breje in doječe samice, pri čemer se lahko zagotovijo tudi primerjalne informacije (matere v primerjavi s potomci). Potomci se za vrednotenje nevrotoksičnosti naključno izberejo iz legel. Vrednotenje zajema opazovanje makroskopskih nevroloških in vedenjskih sprememb, vključno z oceno telesnega razvoja, vedenjske ontogenije, motorične aktivnosti, motorične in senzorične funkcije, učenja in spominjanja ter vrednotenjem teže možganov in nevropatologije med poporodnim razvojem in odraslo dobo.

6. Če je preskusna metoda izvedena kot ločena študija, se lahko dodatne razpoložljive živali iz vsake skupine uporabijo za posebne nevrovedenjske, nevropatološke, nevrokemične ali elektrofiziološke postopke, ki lahko dopolnijo podatke, dobljene s preiskavami, ki se priporočajo po tej metodi (16) (19) (20) (21). Dopolnilni postopki so lahko posebno koristni, kadar empirična opazovanja, pričakovani učinki ali mehanizem/način delovanja kaže posebno vrsto nevrotoksičnosti. Ti dopolnilni postopki se lahko uporabijo pri materah in mladičih. Uporabijo se lahko tudi postopki *ex vivo* ali *in vitro*, če ne spremenijo celovitosti postopkov *in vivo*.

PRIPRAVE ZA PRESKUS

Izbira živalskih vrst

7. Priporočena preskusna vrsta je podgana; druge vrste se lahko uporabijo, če je primerno. Vendar je treba opozoriti, da so dnevi brejosti in dnevi po rojstvu, navedeni v tej preskusni metodi, značilni za običajno uporabljene seve podgan, pri čemer je treba izbrati primerljive dneve, če se uporabijo druge vrste ali neobičajni sev. Uporabo drugih vrst je treba utemeljiti na podlagi podatkov o strupenosti, farmakokinetičnih podatkov in/ali drugih podatkov. Utemeljitev mora vključevati razpoložljivost poporodnih nevrovedenjskih in nevropatoloških ocen za posamezne vrste. Če že obstaja preskus, ki je povzročil zaskrbljenost, bi bilo treba razmisliti o uporabi vrste/seva, ki je povzročil zaskrbljenost. Zaradi različne učinkovitosti različnih sevov podgan je treba dokazati, da je sev, ki je bil izbran za uporabo, ustrezno ploden in odziven. Dokumentirati je treba zanesljivost in občutljivost drugih vrst za zaznavanje razvojne nevrotoksičnosti.

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

8. Temperatura v prostoru za preskusne živali mora biti 22 ± 3 °C. Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30 % in po možnosti ne presega 70 %, razen med čiščenjem prostora, mora biti cilj 50–60 %. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Ciklus osvetlitve se lahko pred parjenjem in med izvajanjem študije tudi obrne, da se izvede ocena funkcionalnih in vedenjskih končnih točk v obdobju teme (pri rdeči svetlobi), tj. ko so živali običajno aktivne (22). Vse spremembe ciklusa svetlobe in teme morajo vključevati ustrezno aklimatizacijo, da se živalim omogoči prilagoditev na novi ciklus. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Navedeta se vrsta hrane in vode, obe pa se analizirata za kontaminante.

▼M5

9. Živali se lahko nastanijo posamično ali dajo v kletke v manjših skupinah istega spola. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Po dokazu o kopulaciji ali najpozneje 15. dan brejosti se sparjene živali naselijo v kletke za kotitev ali kletke za matere. Kletke je treba razporediti tako, da so morebitni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Ko je kotitev blizu, je treba sparjenim samicam zagotoviti ustrezen in določen material za izdelavo gnezda. Dobro znano je, da ima lahko neustrezno ravnanje ali stres med brejostjo neugodne posledice, vključno izgubo zarodka ter spremenjenim razvojem pred rojstvom in po njem. Da bi preprečili predrojstveno izgubo zaradi dejavnikov, ki niso povezani s tretiranjem, je treba z živalmi med brejostjo ravnati previdno ter se izogibati stresu zaradi zunanjih dejavnikov, na primer čezmernega zunanjega hrupa.

Priprava živali

10. Uporabiti je treba zdrave živali, ki so prilagojene na laboratorijske razmere in predhodno niso bile uporabljene za poskuse, razen če je študija vključena v drugo študijo (glej odstavek 3). Opredeliti je treba vrsto, sev, vir, spol, težo in starost preskusnih živali. Vsaki živali se dodeli edinstvena identifikacijska številka, s katero se označi. Živali iz vseh preskusnih skupin morajo imeti čim bolj enako težo in starost ter biti v običajnem razponu vrst in seva iz študije. Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti mlade odrasle samice, ki še niso kotile. Sorojenci se ne smejo pariti, kar je treba skrbno zagotoviti. Dan brejosti (DB) 0 je dan, ko se opazi vaginalni čep in/ali seme. Pri nakupu brejih živali pri dobavitelju je treba omogočiti ustrezen čas aklimatizacije (npr. 2–3 dni). Sparjene samice je treba na nepristranski način razdeliti v kontrolne in tretirane skupine ter jih med skupinami čim bolj enakomerno porazdeliti (npr. za zagotovitev enakomerne porazdelitve med skupinami, kot je razdelitev na podlagi telesne teže, se priporoča stratificiran naključni postopek). Samice, ki jih osemeni isti samec, je treba enakomerno razdeliti med skupine.

POSTOPEK

Število in spol živali

11. Vsaka preskusna in kontrolna skupina mora vključevati zadostno število brejih samic, ki bodo izpostavljene preskusni kemikaliji, za zagotovitev, da se skoti ustrezno število potomcev za vrednotenje nevrotoksičnosti. Za vsak odmerek je priporočenih 20 zarodov. Zasnove za odmerjanje v ponovitveni in postopni skupini so dovoljene, če je doseženo skupno število zarodov na skupino in se za ponovitve upoštevajo ustrezni statistični modeli.

12. Na poporodni dan (PPD) 4 ali pred njim (dan kotitve je PPD 0) je treba velikost posameznega zaroda prilagoditi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, da so vsi zarodi enako veliki (23). Velikost zaroda ne sme presegati povprečne velikosti zaroda za uporabljeni sev glodavcev (8–12). V zarodu mora biti čim bolj uravnoteženo število mladih samcev in samic. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže, ni ustrezno. Po standardizaciji zarodov (izločevanju) in pred nadaljnjim preskušanjem funkcionalnih končnih točk je treba posamezne mladiče, ki so predvideni za preskušanje pred odstranitvijo od sesanja in po njej, označiti z edinstvenimi oznakami s pomočjo katere koli primerne humane metode označevanja mladičev (npr. 24).

▼M5

Dodelitev živali za funkcionalne in vedenjske preskuse, tehtanje možganov ter nevropatološka vrednotenja

13. Preskusna metoda omogoča različne pristope glede na dodelitev živali, ki so bile izpostavljene *in utero* in v obdobju laktacije, za funkcionalne in vedenjske preskuse, spolno zrelost, določanje teže možganov ter nevropatološko vrednotenje (25). Drugi preskusi nevrovedenjske funkcije (npr. socialno vedenje), nevrokemije ali nevropatologije se lahko dodajo glede na posamezni primer, če se ne ogrozi celovitost izvirnega preskusa.

14. Iz vsake tretirane skupine se izberejo mladiči, ki se nato dodelijo za oceno končnih točk na PPD 4. Mladiče je treba izbrati tako, da sta oba spola iz vsakega zaroda v vsaki tretirani skupini čim bolj enakomerno zastopana v vseh preskusih. Za preskušanje motorične aktivnosti je treba preskusiti isti par mladega samca in samice pri vseh starostih pred odstranitvijo od sesanja (glej odstavek 35). Pri vseh drugih preskusih se lahko za različne vedenjske preskuse dodelijo isti ali ločeni pari samcev in samic. Za primerjalne preskuse kognitivne funkcije med odstavljenci in odraslimi živalmi bo morda treba dodeliti različne mladiče, da se preprečijo zavajajoči učinki starosti in predhodnega usposabljanja na te meritve (26) (27). Pri odstranitvi od sesanja (PPD 21) se lahko mladiči, ki niso bili izbrani za preskušanje, humano odstranijo. Navesti je treba vsako spremembo razdelitve mladičev. Statistična enota meritve mora biti zarod (ali mati) in ne mladič.

15. Obstaja več načinov za dodelitev mladičev za preglede pred odstranitvijo od sesanja in po njej, kognitivne preskuse, patološke preglede itd. (glej sliko 1 za splošni načrt in Dodatek 1 za primere dodelitve). Priporočena najmanjša števila živali v posamezni tretirani skupini za preglede pred odstranitvijo od sesanja in po njej so naslednja:

Klinična opazovanja in telesna teža	Vse živali
Podrobna klinična opazovanja	20/spol (1/spol/zarod)
Teža možganov (po fiksaciji), PPD 11–22	10/spol (1/zarod)
Teža možganov (nefiksirani), ~ PPD 70	10/spol (1/zarod)
Nevropatologija (fiksacija s potopitvijo ali perfuzijo), PPD 11–22	10/spol (1/zarod)
Nevropatologija (fiksacija s perfuzijo), PPD ~ 70	10/spol (1/zarod)
Spolna zrelost	20/spol (1/spol/zarod)
Drugi razvojni znaki (neobvezno)	Vse živali
Vedenjska ontogenija	20/spol (1/spol/zarod)
Motorična aktivnost	20/spol (1/spol/zarod)
Motorična in senzorična funkcija	20/spol (1/spol/zarod)
Učenje in spominjanje	10/spol ([a]) (1/zarod)

([a]) Glede na občutljivost preskusov kognitivne funkcije je treba razmisliti o preiskavi večjega števila živali, npr. največ 1 samca in 1 samice na zarod (za dodelitev živali glej Dodatek 1) (nadaljnja navodila glede velikosti vzorca so navedena v Smernici OECD št. 43 (8)).

▼M5

Odmerjanje

16. Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov in hkratni kontrolni vzorec. Velikost odmerkov se razporedi tako, da se učinki strupenosti stopnjujejo. Če največji odmerek ni omejen s fizikalno-kemijskimi ali biološkimi lastnostmi kemikalije, ga je treba izbrati tako, da izzove določene strupene učinke pri materi (npr. klinični znaki, manjše pridobivanje telesne teže (ne več kot 10 %) in/ali dokaz za toksičnost, pri kateri se omeji odmerek, v tarčnem organu). Velik odmerek je z nekaterimi izjemami lahko omejen na 1 000 mg/kg/dan telesne teže. Pričakovana izpostavljenost pri ljudeh lahko na primer kaže na potrebo po uporabi večjega odmerka. Namesto tega se lahko izvedejo pilotne študije ali predhodne študije za ugotavljanje območja, da se določi največji odmerek, ki ga je treba uporabiti in bi moral povzročiti minimalno stopnjo strupenih učinkov pri materi. Če se s standardno študijo strupenosti za razvoj ali pilotno študijo dokaže, da je preskusna kemikalija strupena za razvoj, mora biti največja velikost odmerka največji odmerek, ki ne bo povzročil čezmernih strupenih učinkov pri potomcih ali smrti *in utero* ali pred rojstvom ali deformnosti, ki lahko prepreči smiselno vrednotenje nevrotoksičnosti. Najmanjša velikost odmerka naj ne bi povzročila dokazov o strupenih učinkih pri materi ali razvoju, vključno z nevrotoksičnostjo. Izbere se padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi z odmerkom povezani odzivi in velikost odmerka, pri kateri ni opaženih škodljivih učinkov (NOAEL) ali odmerki blizu meje zaznavnosti, ki omogoča določitev standardnega odmerka. Za padajoče zaporedje velikosti odmerkov so pogosto optimalni dvakratni do štirikratni intervali, pogosto pa je bolje dodati še dodatno četrto skupino odmerkov, kot uporabiti zelo velike intervale (npr. več kot faktor 10) med odmerki.

17. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o strupenosti ter dodatne informacije o presnovi in toksikokinetiki preskusne kemikalije ali sorodnih snovi. Te informacije lahko pomagajo tudi pri dokazovanju ustreznosti režima odmerjanja. Na podlagi izpostavljenosti in farmakokinetičnih informacij (28) (29) je treba pri mladičih razmisliti o uporabi neposrednega odmerjanja. Pred izvajanjem študije neposrednega odmerjanja je treba skrbno obravnavati prednosti in slabosti (30).

18. Skupina za hkratno kontrolo mora biti kontrolna skupina, tretirana z nepravim nadomestkom, ali kontrolna skupina, tretirana z nosilcem, če je ta uporabljen pri dajanju preskusne kemikalije. Vsem živalim je treba običajno dati enako količino preskusne kemikalije ali nosilca na podlagi telesne teže. Če se za lažje odmerjanje uporablja nosilec ali drug aditiv, je treba upoštevati naslednje lastnosti: učinke na absorpcijo, distribucijo, presnovo ali retencijo preskusne kemikalije, učinke na kemijske lastnosti preskusne kemikalije, ki lahko spremenijo njene strupene lastnosti, ter učinke na porabo hrane ali vode ali status prehranjenosti živali. Nosilec ne sme povzročati učinkov, ki bi lahko vplivali na razlago študije, ne sme biti nevrovedenjsko strupen ali imeti učinkov na razmnoževanje ali razvoj. V zvezi z novimi nosilci je treba poleg kontrolne skupine, tretirane z nosilcem, vključiti tudi kontrolno skupino, tretirano z nepravim nadomestkom. Z živalmi v kontrolni(-h) skupini(-ah) se ravna na enak način kot z živalmi v preskusni skupini.

▼M5

Dajanje odmerkov

19. Preskusno kemikalijo ali nosilec je treba dajati na način, ki je najprimernejši za možno izpostavljenost pri ljudeh, ter na podlagi razpoložljivih podatkov o presnovi in distribuciji pri preskusnih živalih. Način dajanja odmerka je običajno oralen (npr.z gavažo, hrano ali pitno vodo), vendar se lahko glede na lastnosti in pričakovane ali znane načine izpostavljenosti pri ljudeh uporabijo tudi drugi načini (npr. prek kože, z vdihavanjem); dodatna navodila so navedena v Smernici št. 43 (8). Izbrani način dajanja je treba utemeljiti. Preskusno kemikalijo je treba dati vsak dan približno ob istem času.

20. Odmerek za vsako žival mora običajno temeljiti na zadnji posamični določitvi telesne teže. Vendar je potrebna previdnost pri prilagajanju odmerkov v zadnji tretjini brejosti. Če se pri tretiranih materah opazijo čezmerni strupeni učinki, je treba te živali humano usmrtiti.

21. Preskusno kemikalijo ali nosilec je treba sparjenim samicam dajati vsaj vsak dan od dneva ugnezditve (DB 6) do konca laktacije (PPD 21), da so mladiči izpostavljeni preskusni kemikaliji med nevrološkim razvojem pred rojstvom in po njem. Starost, pri kateri se začne odmerjanje, ter trajanje in pogostost odmerjanja se lahko prilagodijo, če dokazi podpirajo zasnovo poskusa, ki je primernejši za izpostavljenost pri ljudeh. Trajanje odmerjanja je treba prilagoditi za druge vrste, da se zagotovi izpostavljenost v vseh zgodnjih fazah razvoja možganov (npr. enakovredno rasti možganov človeka pred rojstvom in takoj po rojstvu). Odmerjanje se lahko začne ob začetku brejosti (DB 0), čeprav je treba upoštevati, da lahko preskusne kemikalije povzročijo izgubo pred ugnezditvijo. Z dajanjem odmerka na DB 6 se prepreči to tveganje, vendar razvojne faze med DB 0 in 6 niso tretirane. Če laboratorij kupi breje živali, začetek odmerjanja na DB 0 ni mogoč, zato je DB 6 primeren čas za začetek. Laboratorij za preskušanje mora režim odmerjanja določiti v skladu z zadevnimi informacijami o učinkih preskusne kemikalije, predhodnimi izkušnjami in logističnimi težavami, kar lahko vključuje podaljšanje odmerjanja tudi na obdobje po odstavitvi od sesanja. Pri živalih, ki niso skotile vseh potomcev, se odmerjanje na dan kotitve ne izvede. Na splošno se pričakuje, da bodo mladiči izpostavljeni prek materinega mleka, vendar je treba v primerih, kjer ni dovolj dokazov za nadaljnjo izpostavljenost potomcev, razmisliti o neposrednem odmerjanju. Dokaz o stalni izpostavljenosti se lahko pridobi npr. na podlagi farmakokinetičnih informacij, strupenosti za potomce ali spremembami biomarkerjev (28).

OPAZOVANJA

Opazovanja pri materah

22. Pri vseh materah je treba vsaj enkrat na dan skrbno opazovati njihovo zdravstveno stanje, vključno z obolevnostjo in smrtnostjo.

23. V obdobjih tretiranja in opazovanja je treba redno izvajati več podrobnih kliničnih opazovanj (vsaj dve v obdobju odmerjanja med brejostjo in dve v obdobju odmerjanja med laktacijo) z vsaj desetimi materami na velikost odmerka. Živali morajo zunaj njihove domače kletke opazovati usposobljeni tehniki, ki niso seznanjeni s tretiranjem živali, in sicer po standardiziranih postopkih, da se čim bolj zmanjšata stres za živali in pristranskost opazovalca ter zagotovi čim bolj konstantna zanesljivost med opazovalci. Kadar je mogoče, je priporočljivo, da opazovanja v okviru posamezne študije opravi isti tehnik.

▼M5

24. Prisotnost opaženih znakov je treba zabeležiti. Vedno, kadar je to izvedljivo, je treba zabeležiti tudi stopnjo opaženih znakov. Klinična opazovanja morajo obsegati tudi, vendar ne samo, spremembe na koži, kožuhu, očeh, sluznicah, pojav sekrecije ter delovanje avtonomnega živčevja (npr. solzenje, piloerekcija, velikost zenic, nenormalen vzorec dihanja in/ali dihanje skozi usta ter vsi nenavadni znaki pri uriniranju ali izločanju blata).

25. Zapisati je treba tudi vse nenavadne odzive v zvezi s položajem telesa, stopnjo aktivnosti (npr. zmanjšanje ali povečanje raziskovanja standardnega mesta) in koordinacijo gibov. Zabeležiti je treba spremembe v hoji (npr. zibanje, ataksija), drži (npr. grbast hrbet) in reagiranju na ravnanje, nameščanje ali druge okoljske dražljaje, pa tudi navzočnost kloničnih ali toničnih gibov, krčev ali tremorja, stereotipije (npr. čezmerno čiščenje, nenavadni gibi z glavo, ponavljajoče se krožno premikanje), nenormalno vedenje (npr. grizenje ali čezmerno lizanje, samopohaba, zadenjska hoja, oddajanje glasov) ali agresivnost.

26. Zabeležiti je treba znake strupenosti, vključno z dnevom nastopa, časom dneva, stopnjo in trajanjem.

27. Živali je treba v času odmerjanja med študijo stehtati vsaj enkrat na teden, blizu dneva kotitve ali na dan kotitve in na PPD 21 (odstavitev od sesanja). Pri študijah z gavažo je treba matere stehtati vsaj dvakrat na teden. Odmerke je treba ustrezno prilagoditi ob posameznem določanju telesne teže. Porabo hrane je treba meriti vsaj vsak teden med brejostjo in laktacijo. Porabo vode je treba meriti vsaj enkrat na teden, če izpostavljenost poteka prek oskrbe z vodo.

Opazovanja pri potomcih

28. Pri vseh potomcih je treba vsaj enkrat na dan opazovati znake strupenosti ter obolevnost in smrtnost.

29. V obdobjih tretiranja in opazovanja je treba izvesti podrobnejša klinična opazovanja potomcev. Potomce (vsaj enega mladiča/spol/zarod) morajo opazovati usposobljeni tehniki, ki niso seznanjeni s tretiranjem živali, in sicer po standardiziranih postopkih, da se čim bolj zmanjša pristranskost in čim bolj poveča zanesljivost opazovalcev. Kadar je mogoče, je priporočljivo, da opazovanja opravi isti tehnik. V opazovani fazi razvoja je treba ustrezno spremljati vsaj končne točke, opisane v odstavkih 24 in 25.

30. Zabeležiti je treba vse znake strupenosti pri potomcu, vključno z dnevom nastopa, časom dneva, stopnjo in trajanjem.

Telesni in razvojni znaki

31. Spremembe znakov razvoja pred odstavitvijo od sesanja (npr. znotrajmaternično oblikovanje uhlja, odpiranje oči, izraščanje sekalcev) so tesno povezane s telesno težo (30) (31). Telesna teža je lahko najboljši pokazatelj telesnega razvoja. Merjenje razvojnih znakov je zato priporočljivo le, če obstajajo predhodni dokazi, da bodo te končne točke zagotovile dodatne informacije. Časovna razporeditev ocene teh parametrov je navedena v tabeli 1. Glede na pričakovane učinke in rezultate začetnih meritev se lahko priporoča dodajanje časovnih točk ali opravljanje meritev v drugih razvojnih fazah.

▼M5

32. Pri oceni telesnega razvoja je priporočljivo uporabiti postkoitalno starost namesto postnatalne starosti (33). Če se preskus pri mladičih izvede na dan odstavitve od sesanja, je priporočljivo, da se ta preskus izvede pred dejansko odstavitvijo od sesanja, da se prepreči zavajajoči učinek stresa, povezanega z odstavitvijo od sesanja. Poleg tega se preskusov na mladičih po odstavitvi od sesanja ne sme izvajati dva dni po odstavitvi od sesanja.

Tabela 1

Časovna razporeditev ocene telesnih in razvojnih znakov ter funkcionalnih/vedenjskih končnih točk ([a])

Starostna obdobja / Končne točke	Pred odstavitvijo od sesanja ([b])	Adolescenca ([b])	Mladi odrasli ([b])
Telesni in razvojni znaki			
Telesna teža in klinična opazovanja	vsak teden ([c])	vsaj vsaka dva tedna	vsaj vsaka dva tedna
Teža možganov	PPD 22 ([d])		ob koncu
Nevropatologija	PPD 22 ([d])		ob koncu
Spolna zrelost	—	kot je ustrezno	—
Drugi razvojni znaki ([e])	kot je ustrezno	—	—
Funkcionalne/vedenjske končne točke			
Vedenjska ontogenija	vsaj dve meritvi		
Motorična aktivnost (vključno s privajanjem)	1–3-krat ([f])	—	enkrat
Motorična in senzorična funkcija	—	enkrat	enkrat
Učenje in spominjanje	—	enkrat	enkrat

([a]) V tej tabeli je predstavljeno najmanjše število meritev, ki jih je treba izvesti. Glede na pričakovane učinke in rezultate začetnih meritev se lahko priporoča dodajanje dodatnih časovnih točk (npr. stare živali) ali opravljanje meritev v drugih razvojnih fazah.

([b]) Priporoča se, da se preskusi na mladičih ne izvajajo dva dni po odstavitvi od sesanja (glej odstavek 32). Priporočeni starosti za preskuse v adolescenci sta: učenje in spominjanje = PPD 25 ± 2; motorična in senzorična funkcija = PPD 25 ± 2. Priporočena starost za preskuse na mladih odraslih je PPD 60–70.

([c]) Telesno težo je treba v primeru neposrednega odmerjanja izmeriti vsaj dvakrat na teden, da se odmerki prilagodijo v času hitrega pridobivanja telesne teže.

([d]) Teža možganov in nevropatologija se lahko ocenita prej (npr. na PPD 11), če je primerno (glej odstavek 39).

([e]) Druge razvojne znake, poleg telesne teže (npr. odpiranje oči), je treba zabeležiti, kadar je primerno (glej odstavek 31).

([f]) Glej odstavek 35.

33. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, npr. z vizualnim pregledom ali meritvijo zadnjično-genitalne razdalje (34) (35), vsakega mladiča iz zaroda pa je treba stehtati pri rojstvu ali kmalu po tem, vsaj enkrat na teden med laktacijo ter vsaj enkrat vsaka dva tedna po njej. Ko se ovrednoti spolna zrelost, je treba ob pojavu odprtja nožnice (36) ali ločitvi prepucija (37) določiti starost in telesno težo vsaj enega samca in ene samice iz zaroda.

▼M5

Vedenjska ontogenija

34. Ontogenijo izbranih vedenj je treba izmeriti pri vsaj enem mladiču/spol/zarod v ustreznem starostnem obdobju, pri čemer se ob vseh dnevih preskušanja za vsa ocenjena vedenja uporabijo isti mladiči. Dnevi meritve morajo biti v tem obdobju enakomerno razporejeni, da se opredelijo običajne spremembe v ontogeniji tega vedenja ali spremembe v ontogeniji tega vedenja, povezane s tretiranjem (38). Nekateri primeri vedenj, katerih ontogenija se lahko oceni, so: posturalni refleks, negativna geotaksija in motorična aktivnost (38) (39) (40).

Motorična aktivnost

35. Motorično aktivnost je treba spremljati (41) (42) (43) (44) (45) v obdobju pred odstavitvijo od sesanja in v obdobju odraslosti. Za preskušanje v času odstavljanja od sesanja glej odstavek 32. Preskušanje mora biti dovolj dolgo, da se dokaže privajanje netretiranih kontrolnih vzorcev na preskušanje. Za oceno vedenjske ontogenije se zelo priporoča uporaba motorične aktivnosti. Če se preskušanje uporabi kot preskus vedenjske ontogenije, je za vsa preskušanja pred odstavitvijo od sesanja treba uporabiti iste živali. Preskušanje mora biti dovolj pogosto, da se oceni ontogenija privajanja med preskušanjem (44). To lahko pomeni trikrat ali pogosteje pred dnem odstavitve od sesanja in vključno z njim (npr. PPD 13, 17 in 21). Preskušanje istih živali ali živali iz istega zaroda mora potekati tudi v obdobju odraslosti proti koncu študije (npr. PPD 60–70). Po potrebi se lahko opravi preskušanje ob dodatnih dneh. Motorično aktivnost je treba spremljati z aparaturo za avtomatizirano beleženje aktivnosti, ki mora biti zmožna zaznati povečanje in zmanjšanje aktivnosti (npr. osnovna aktivnost, kot jo izmeri naprava, ne sme biti tako nizka, da bi preprečila zaznavanje zmanjšanja, in ne tako visoka, da bi preprečila zaznavanje povečanja aktivnosti). Vsako napravo je treba preskusiti v skladu s standardnimi postopki, da se zagotovi čim bolj zanesljivo delovanje naprav vse dni. Tretirane skupine morajo biti čim bolj uravnoteženo razporejene med napravami. Vsako žival je treba preskusiti ločeno. Tretirane skupine morajo biti uravnoteženo razporejene med čase preskušanja, da se prepreči zavajajoči učinek cirkadianega ritma aktivnosti. Prizadevati si je treba, da so variacije v preskusnih pogojih minimalne in niso sistematično povezane s tretiranjem. Med spremenljivkami, ki lahko vplivajo na različna merila vedenja, vključno z motorično aktivnostjo, so jakost zvoka, velikost in oblika preskusne kletke, temperatura, relativna vlažnost, svetlobni pogoji, vonji, uporaba domače kletke ali nove preskusne kletke in motnje iz okolja.

Motorična in senzorična funkcija

36. Motorično in senzorično funkcijo je treba natančno pregledati vsaj enkrat v obdobju adolescence in enkrat v obdobju odraslosti (npr. PPD 60–70). Za preskušanje v času odstavljanja od sesanja glej odstavek 32. Treba je izvesti ustrezno preskušanje za zagotovitev ustreznega kvantitativnega vzorčenja senzoričnih dražljajev (npr. somatosenzoričnih, vestibularnih) in motoričnih funkcij (npr. moč, koordinacija). Primeri preskusov motorične in senzorične funkcije so refleks zravnave (46), posturalni refleks (47) (48), reakcija na slušni dražljaj (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54) in izzvani potenciali (55).

▼M5

Preskusi učenja in spominjanja

37. Preskus asociativnega učenja in spominjanja je treba izvesti po odstavitvi od sesanja (npr. 25 ± 2 dni) in pri mladih odraslih (PPD 60 in starejših). Za preskušanje v času odstavljanja od sesanja glej odstavek 32. V teh dveh fazah razvoja se lahko uporabijo isti ali ločeni preskusi. Pri izbiri preskusov učenja in spominjanja pri mladičih, ki so prenehali sesati, in odraslih podganah je dovoljena določena prožnost. Vendar morajo biti preskusi načrtovani tako, da izpolnjujejo dve merili. Prvič, učenje je treba oceniti kot spremembo v več ponovitvenih preskušanjih ali sejah učenja ali s preskusi, ki vključujejo eno preskušanje, ob upoštevanju pogoja, ki kontrolira neasociativne učinke izkušenj. Drugič, preskusi morajo poleg izvirnega učenja (priučitev) vključevati določeno mero (kratkoročnega ali dolgoročnega) spomina, vendar te mere spomina ni mogoče sporočiti brez mere priučitve, ki se pridobi z istim preskusom. Če preskusi učenja in spominjanja kažejo učinek preskusne kemikalije, je morda treba razmisliti o dodatnih preskusih, da se ovržejo druge razlage na podlagi sprememb senzoričnih, motivacijskih in/ali motoričnih zmogljivosti. Poleg zgoraj navedenih meril se priporoča, da se preskus učenja in spominjanja izbere na podlagi dokazane občutljivosti na razred preiskovane kemikalije, če so takšne informacije na voljo v virih. Če takšnih informacij ni, primeri preskusov, ki bi lahko izpolnjevali navedeni merili, vključujejo: pasivno izogibanje (43) (56) (57), zapoznelo uskladitev s položajem pri odraslih podganah (58) in mladičih (59), pogojevanje z vonjem (43) (60), Morrisov vodni labirint (61) (62) (63), Bielov ali Cincinnatijev labirint (64) (65), zvezdasti labirint (66), T-labirint (43) ter priučitev in retencijo vedenja, kontroliranega s planiranim potekom (26) (67) (68). Dodatni preskusi so opisani v virih v zvezi z mladiči, ki so prenehali sesati (26) (27), in odraslimi podganami (19) (20).

Posmrtni pregled

38. Matere se lahko evtanazirajo po odstavitvi potomca od sesanja.

39. Nevropatološko vrednotenje potomca se izvede z uporabo tkiv živali, ki so bile humano usmrčene na PPD 22 ali med PPD 11 in PPD 22 ali ob koncu študije. Pri potomcih, usmrčenih na PPD 22, je treba pregledati možganska tkiva, pri živalih, usmrčenih ob koncu, pa je treba pregledati tkiva centralnega živčnega sistema in perifernega živčnega sistema. Živali, usmrčene na PPD 22 ali prej, se lahko fiksirajo s potopitvijo ali perfuzijo. Živali, usmrčene ob koncu študije, se fiksirajo s perfuzijo. Vsi vidiki priprave vzorcev tkiva od perfuzije živali do seciranja vzorcev tkiv, obdelave tkiv in barvanja preparatov morajo upoštevati uravnoteženo zasnovo, tako da vse serije vsebujejo reprezentativne vzorce posamezne skupine odmerka. Dodatne smernice v zvezi z nevropatologijo so navedene v Smernici OECD št. 20 (9), glej tudi (103).

Obdelava vzorcev tkiv

40. Zabeležiti je treba vse makroskopske anomalije, ki so vidne v času obdukcije. Vzorci tkiv morajo predstavljati vse pomembnejše regije živčnega sistema. Vzorce tkiv je treba hraniti v ustreznem fiksativu in jih obdelati v skladu s standardiziranimi objavljenimi histološkimi protokoli (69) (70) (71) (103). Vstavljanje v parafin je sprejemljivo za tkiva centralnega živčnega sistema in perifernega živčnega sistema, uporaba osmija po fiksaciji, skupaj z vstavljanjem v epoksi, pa je lahko ustrezna, če je potrebna

▼M5

večja stopnja ločljivosti (npr. za periferno živčevje, če obstaja sum na periferno nevropatijo, in/ali za morfometrično analizo perifernega živčevja). Možgansko tkivo, zbrano za morfometrično analizo, je treba vstaviti v ustrezen medij pri vseh velikostih odmerka hkrati, da se preprečijo artefakti zaradi krčenja, ki bi lahko bili povezani s podaljšano hrambo v fiksativu (6).

Nevropatološka preiskava

41. Nameni kvalitativnega pregleda so:

(i) opredeliti regije v živčnem sistemu, ki kažejo dokaze nevropatoloških sprememb;

(ii) opredeliti vrste nevropatoloških sprememb, ki so posledica izpostavljenosti preskusni kemikaliji, in

(iii) določiti stopnjo resnosti nevropatoloških sprememb.

Reprezentativne histološke rezine vzorcev tkiv mora mikroskopsko pregledati ustrezno usposobljen patolog, ki poišče dokaze nevropatoloških sprememb. Vsem nevropatološkim spremembam je treba dodeliti subjektivno oceno resnosti. Hematoksilinska in eozinska barvila so lahko ustrezna za oceno rezin možganov živali, ki so bile humano usmrčene na PPD 22 ali prej. Za rezine tkiv centralnega in perifernega živčnega sistema živali, usmrčenih ob koncu študije, pa se priporoča barvanje z mielinskimi barvili (npr. luksol obstojna modra/krezil vijolična) in barvilom na osnovi srebra (npr. Bielschowskyjevo ali Bodianovo barvilo). Glede na strokovno presojo patologa in vrsto opaženih sprememb se lahko tudi druga barvila štejejo kot ustrezna za ugotavljanje in opis posebnih vrst sprememb (npr. glialni fibrilarni kisli protein (GFAP) ali lektinska histokemija za oceno glialnih in mikroglialnih sprememb (72), fluoro-žad za zaznavanje nekroze (73) (74) ali barvila na osnovi srebra za ugotavljanje degeneracij živčevja (75)).

42. Opraviti je treba morfometrično (kvantitativno) vrednotenje, ker lahko ti podatki prispevajo k zaznavanju učinka, povezanega s tretiranjem, in so dragoceni za razlago razlik v teži možganov ali morfologiji, povezanih s tretiranjem (76) (77). Za morfometrično vrednotenje je treba odvzeti in pripraviti vzorec živčnega tkiva. Morfometrična vrednotenja lahko zajemajo npr. linearne ali površinske meritve posebnih možganskih regij (78). Pri linearnih ali površinskih meritvah je treba uporabiti homologne rezine, ki so skrbno izbrane na podlagi zanesljivih mikroskopskih znakov (6). Stereologija se lahko uporabi za opredelitev učinkov, povezanih s tretiranjem, na spremenljivke, kot so volumen ali število celic za posamezne nevroanatomske regije (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. Pregledati je treba, ali so v možganih dokazi za nevropatološke spremembe, povezane s tretiranjem, pri čemer je treba ustrezne vzorce odvzeti iz vseh pomembnih možganskih regij (npr. vohalni bulbus, možganska skorja, hipokamus, bazalni gangliji, talamus, hipotalamus, srednjimi možgani (tektum, tegmentum in možganski pedunkli), most, podaljšana hrbtenjača in mali možgani), da se zagotovi natančen pregled. Pomembno je, da so vse rezine odvzete iz iste ravnine. Pri odraslih živalih, ki so bile humano usmrčene ob koncu študije, je treba odvzeti reprezentativne rezine hrbtenjače in perifernega živčnega sistema. Območja, ki se pregledujejo, morajo vključevati oko z vidnim živcem in mrežnico, hrbtenjačo ob vratnem in ledvenem delu, dorzalna in ventralna vlakna, proksimalni bedrni živec, proksimalni golenični živec (pri kolenu) in veje goleničnega živca v mečni mišici. Rezine hrbtenjače in perifernih živcev morajo vključevati prečne ali diagonalne in vzdolžne rezine.

▼M5

44. V okviru nevropatološkega vrednotenja je treba poleg celičnih sprememb (npr. vakuolacija, degeneracija in nekroza nevronov) in sprememb tkiva (npr. glioza, infiltracija levkocitov in tvorjenje cist) poiskati morebitne znake razvojnih poškodb živčnega sistema (6) (85) (86) (87) (88) (89). V zvezi s tem je pomembno, da se učinki, povezani s tretiranjem, ločijo od običajnih razvojnih dogodkov, za katere je znano, da se pojavijo v razvojni fazi, ki ustreza času usmrtitve (90). Primeri pomembnih sprememb, ki kažejo na razvojne poškodbe, med drugim vključujejo:

— makroskopske spremembe velikosti ali oblike vohalnega bulbusa, velikih možganov ali malih možganov,

— spremembe relativne velikosti različnih možganskih regij, vključno z zmanjšanjem ali povečanjem velikosti regij zaradi izgube ali obstojnosti običajno prehodnih populacij celic ali projekcij aksonov (npr. zunanja zarodna plast malih možganov, corpus callosum),

— spremembe v množitvi, migraciji in diferenciaciji, kot kažejo območja čezmerne apoptoze ali nekroze, skupin ali razpršenih populacij ektopičnih, dezorientiranih ali deformiranih nevronov, ali spremembe relativne velikosti različnih plasti kortikalnih struktur,

— spremembe vzorcev mielinizacije, vključno s splošnim zmanjšanjem mieliniziranih struktur ali njihovim spremenjenim barvanjem,

— dokaz za hidrocefalus, zlasti povečanje prekatov, stenozo možganskega akvedukta in tanjšanje možganskih polobel.

Analiza odvisnosti med odmerkom in odzivom pri nevropatoloških spremembah

45. Za kvalitativno in kvantitativno nevropatološko analizo se priporoča naslednji postopek s posameznimi koraki. Najprej se rezine iz skupine z velikim odmerkom primerjajo z rezinami iz kontrolne skupine. Če pri živalih iz skupine z velikim odmerkom ni dokazov o nevropatoloških spremembah, nadaljnja analiza ni potrebna. Če v skupini z velikim odmerkom obstajajo dokazi o nevropatoloških spremembah, se pregledajo živali iz skupin s srednjim in nizkim odmerkom. Če se skupina z velikim odmerkom konča zaradi smrti ali druge zavajajoče strupenosti, se za analizo nevropatoloških sprememb uporabijo skupine z velikim in srednjim odmerkom. Če obstajajo znaki nevrotoksičnosti v skupinah z manjšim odmerkom, je treba v teh skupinah opraviti nevropatološko analizo. Če se pri kvalitativnem ali kvantitativnem pregledu ugotovijo nevropatološke spremembe, povezane s tretiranjem, je treba na podlagi vrednotenja vseh živali iz skupin z vsemi odmerki določiti odvisnost pojavnosti od odmerka, pogostost in stopnjo resnosti poškodb ali morfometričnih sprememb. V to vrednotenje je treba vključiti vse regije možganov, v katerih so vidni dokazi nevropatoloških sprememb. Za vsako vrsto poškodbe je treba opisati značilnosti, ki so uporabljene za opredelitev posamezne stopnje resnosti in kažejo lastnosti, na podlagi katerih se stopnje razlikujejo med sabo. Zabeležiti je treba pogostost posamezne vrste poškodb in njihovo stopnjo resnosti ter opraviti statistično analizo, da se ovrednoti vrsta odvisnosti med odmerkom in odzivom. Priporočena je uporaba kodiranih mikroskopskih preparatov (91).

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

46. Podatke je treba sporočati ločeno in jih povzeti v obliki tabele, kjer so za vsako preskusno skupino prikazane vrste sprememb ter število mater in potomcev po spolu in zarodu, ki prikazuje posamezno vrsto spremembe. Če je bila izvedena neposredna izpostavljenost potomca po rojstvu, je treba sporočiti način, trajanje in obdobje izpostavljenosti.

▼M5

Vrednotenje in razlaga rezultatov

47. Študija razvojne nevrtoksičnosti bo zagotovila informacije o učinkih ponavljajoče se izpostavljenosti kemikaliji *in utero* in v zgodnjem razvoju po rojstvu. Ker je poudarek tako na splošni strupenosti kot na razvojni nevrotoksičnosti končnih točk, rezultati študije omogočajo razlikovanje med učinki na razvoj živčevja, ki se pojavijo v odsotnosti splošne strupenosti pri materi, in učinki, ki so izraženi samo na stopnjah, ki so strupene tudi za mater. Zaradi zapletenih medsebojnih odvisnosti med zasnovo študije, statistično analizo in biološko pomembnostjo podatkov bo ustrezna interpretacija podatkov o razvojni nevrotoksičnosti vključevala strokovno presojo (107) (109). Razlaga rezultatov preskusa mora temeljiti na pristopu tehtnosti dokazov (20) (92) (93) (94). Obravnavati je treba vzorce vedenjskih ali morfoloških ugotovitev, če obstajajo, in dokaze o odzivu na odmerek. V to opredelitev je treba vključiti podatke iz vseh študij, ki zadevajo vrednotenje razvojne nevrotoksičnosti, vključno z epidemiološkimi študijami na ljudeh ali poročili o primerih in eksperimentalnimi študijami na živalih (npr. podatki o toksikonetiki, informacije o aktivnosti strukture in podatke iz drugih študij strupenosti). To vključuje odvisnost med odmerki preskusne kemikalije in prisotnostjo ali odsotnostjo, pojavnostjo in obsegom katerega koli nevrotoksičnega učinka za posamezni spol (20) (95).

48. Vrednotenje podatkov mora vključevati razpravo o biološki pomembnosti in statistični značilnosti. Statistične analize je treba obravnavati kot orodje, ki usmerja razlago podatkov, vendar je ne določa. Odsotnost statistične značilnosti ne sme biti edini razlog za sklep o odsotnosti učinkov, povezanih s tretiranjem, tako kot statistična značilnost ne sme biti edina utemeljitev za sklepno ugotovitev o učinku, povezanem s tretiranjem. Da bi preprečili morebitne lažno negativne ugotovitve in neločljive težave pri „dokazovanju negativnega rezultata“, je treba obravnavati razpoložljive pozitivne podatke in pretekle kontrolne podatke, zlasti če ni učinkov, povezanih s tretiranjem (102) (106). Verjetnost lažno pozitivnih rezultatov je treba obravnavati ob upoštevanju statističnega vrednotenja vseh podatkov (96). Vrednotenje mora vključevati odnos med ugotovljenimi nevropatološkimi in vedenjskimi spremembami, če obstaja.

49. Vse rezultate je treba analizirati z uporabo statističnih modelov, ki ustrezajo zasnovi preskusa (108). Izbiro parametrske ali neparametrske analize je treba utemeljiti z upoštevanjem dejavnikov, kot so vrsta podatkov (pretvorjeni ali ne) in njihova porazdelitev ter relativna zanesljivost izbrane statistične analize. Statistične analize morajo biti izbrane ob upoštevanju namena in zasnove študije, da se čim bolj zmanjšajo napake tipa I (lažno pozitivni rezultati) in tipa II (lažno negativni rezultati) (96) (97) (104) (105). Razvojne študije, v katerih se uporabljajo multiparne vrste in preskuša več mladičev na zarod, morajo v statistični model vključiti zarod, da se preprečijo povečane stopnje napak tipa I (98) (99) (100) (101). Statistična enota meritve mora biti zarod in ne mladič. Preskuse je treba zasnovati tako, da se živali iz istega zaroda ne obravnavajo kot neodvisna opazovanja. Vse končne točke, ki se vedno znova izmerijo pri istem subjektu, je treba analizirati z uporabo statističnih modelov, ki upoštevajo odvisnost navedenih meritev.

Poročilo o preskusu

50. Poročilo o preskusu mora vključevati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— agregatno stanje in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijske podatke, vključno z virom,

▼M5

— čistost pripravka ter znane in/ali pričakovane nečistote.

Nosilec (po potrebi):

— utemeljitev izbire nosilca, če to ni voda ali fiziološka raztopina.

Preskusne živali:

— uporabljene vrste in seve ter utemeljitev, če to ni podgana,

— dobavitelja preskusnih živali,

— število, začetno starost in spol živali,

— izvor, nastanitvene pogoje, hrano, vodo itd.,

— težo posamezne živali na začetku preskusa.

Preskusni pogoji:

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov,

— utemeljitev načina in trajanja odmerjanja,

— specifikacije uporabljenih odmerkov, vključno s podatki o nosilcu, količini in fizični obliki danega materiala,

— podrobne podatke o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka,

— metodo, uporabljeno za edinstveno identifikacijo mater in potomcev,

— podroben opis postopkov randomizacije, uporabljenih za razdelitev mater v tretirane skupine, izbiro mladičev za izločitev in razdelitev mladičev v preskusne skupine,

— podrobne podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— če je primerno, pretvorbo koncentracije preskusne kemikalije, vnesene s hrano ali vodo ali vdihavanjem (ppm), v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan),

— okoljske pogoje,

— podrobne podatke o kakovosti hrane in vode (npr. voda iz pipe, destilirana voda),

— datum začetka študije in datum konca študije.

Opazovanje in preskusni postopki:

— podroben opis postopkov, uporabljenih za standardizacijo opazovanj in postopkov ter operativne opredelitve za vrednotenje opazovanj,

— seznam vseh uporabljenih preskusnih postopkov in utemeljitev njihove uporabe,

— podrobnosti o uporabljenih vedenjskih/funkcionalnih, patoloških, nevrokemijskih in elektrofizioloških postopkih, vključno z informacijami in podrobnostmi o avtomatiziranih napravah,

— postopke za umerjanje in zagotavljanje enakovrednosti naprav ter uravnoteženje tretiranih skupin v preskusnih postopkih,

— kratko utemeljitev, s katero se pojasnijo odločitve na podlagi strokovne presoje.

▼M5

Rezultati (posamezni rezultati in povzetek, vključno s srednjo vrednostjo in varianco, če je ustrezno):

— število živali na začetku študije in število na koncu študije,

— število živali in zarodov, uporabljenih za posamezno preskusno metodo,

— identifikacijsko številko posamezne živali in zarod, iz katerega prihaja,

— velikost zaroda in povprečno težo pri rojstvu po spolu,

— telesno težo in podatke o spremembi telesne teže, vključno s terminalno telesno težo matere in potomcev,

— podatke o porabi hrane in, če je ustrezno, podatke o porabi vode (npr. če se preskusna kemikalija daje prek vode),

— podatke o odzivu na strupenost po spolu in velikost odmerka, vključno z znaki strupenost ali smrtnosti, vključno s časom in vzrokom smrti, če je ustrezno,

— vrsto, resnost, trajanje, dan nastopa, čas dneva in nadaljnji potek podrobnih kliničnih opazovanj,

— vrednotenje posameznih razvojnih znakov (teža, spolna zrelost in vedenjska ontogenija) pri posamezni časovni točki opazovanja,

— podroben opis vseh vedenjskih, funkcionalnih, nevropatoloških, nevrokemijskih in elektrofizioloških ugotovitev po spolu, vključno s povečanjem in zmanjšanjem iz kontrolnih skupin,

— izsledke obdukcije,

— teže možganov,

— diagnoze, ki izhajajo iz nevroloških znakov in poškodb, vključno z naravno nastalimi boleznimi ali stanji,

— slike vzorčnih ugotovitev,

— slike majhne povečave za oceno homologije rezin, uporabljenih za morfometrijo,

— podatke o absorpciji in presnovi, vključno z dopolnilnimi podatki iz ločene študije toksikokinetike, če so na voljo,

— statistično obdelavo rezultatov, vključno s statističnimi modeli, uporabljenimi za analizo podatkov, in rezultate, ne glede na to, ali so bili značilni ali ne,

— seznam osebja, ki je sodelovalo pri študiji, vključno s strokovno usposobljenostjo.

Razprava o rezultatih:

— informacije o odzivu na odmerek po spolu in skupini,

— povezanost katerih koli drugih strupenih učinkov s sklepno ugotovitvijo o nevrotoksičnem potencialu preskusne kemikalije po spolu in skupini,

— vpliv katerih koli informacij o toksikokinetiki na sklepne ugotovitve,

— podobnost učinkov na kateri koli znan nevrotoksikant,

▼M5

— podatke, ki dokazujejo zanesljivost in občutljivost preskusne metode (tj. pozitivne podatke in pretekle kontrolne podatke),

— odvisnosti, če obstajajo, med nevropatološkimi in funkcionalnimi učinki,

— vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL) ali standardni odmerek za matere in potomce po spolu in skupini.

Sklepne ugotovitve:

— razprava o celotni razlagi podatkov na podlagi rezultatov, vključno s sklepno ugotovitvijo o tem, ali je preskusna kemikalija povzročila razvojno nevrotoksičnost, in vrednostih brez opaznih škodljivih učinkov.

VIRI

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Na voljo na: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Na voljo na: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79–91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101–111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93–100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Na voljo na: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage=en)].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Na voljo na: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173–292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188–197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Poglavje B.34 te priloge, Preskus strupenosti za razmnoževanje na eni generaciji.

(15) Poglavje B.35 te priloge, Študija dvogeneracijske reproduktivne strupenosti.

(16) Poglavje B.43 te priloge, Študija nevrotoksičnosti na glodalcih.

(17) Poglavje B.31 te priloge, Študija strupenosti za predrojstveni razvoj.

(18) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals* (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Na voljo na: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Na voljo na: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499–509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2–6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110–112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118–136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87–94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1–4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433–439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449–457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383–390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350–365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579–586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298–303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489–95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896–920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, str. 67–100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53–66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, str. 37–82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117–129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247–260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599–609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405–411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661–669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589–591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, str. 287–351.

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107–128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, str. 181–211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199–211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25–30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. str. 125–145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321–332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247–296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237–244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98–105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465–479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47–60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29–69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60–90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235–241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387–399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327–332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342–352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122–131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, str. 84–107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291–304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123–130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365–372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745–755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417–432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305–310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262–268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707–710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51–61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113–121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294–298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, str. 3–41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70–74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127–133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401–405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113–126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21–27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329–335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165–172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221–228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587–90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345–352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34:296–313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205–210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295–301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288–325.

▼**M5**

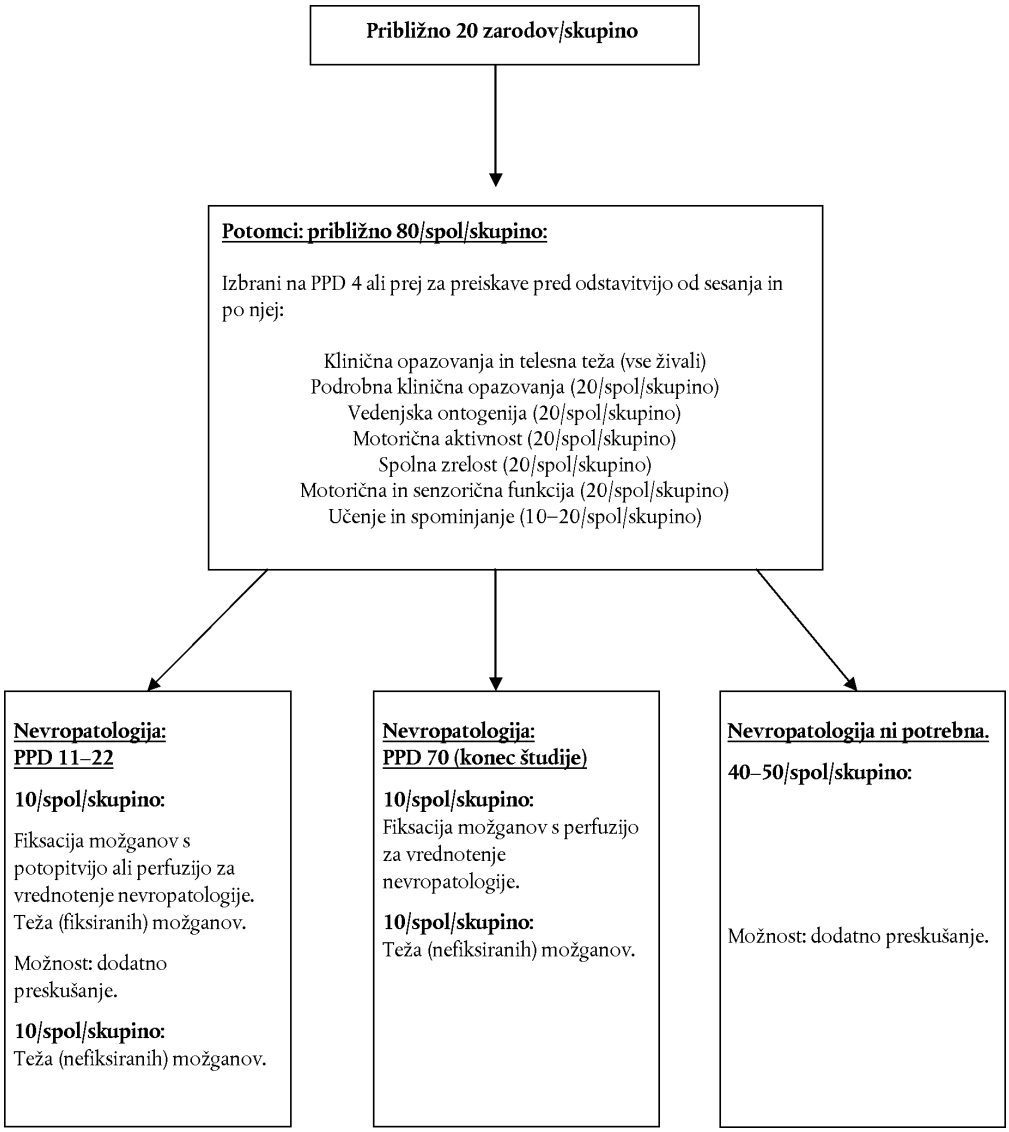
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

▼**M5**

Slika 1

Splošni načrt preskušanja za funkcionalne/vedenjske preskuse, vrednotenje nevropatologije in težo možganov. Ta diagram temelji na opisu iz odstavkov 13–15 (PPD = poporodni dan). Primeri dodelitev živali so navedeni v Dodatku 1.



▼M5

Dodatek 1

1. Primeri možnih dodelitev so opisani in prikazani v obliki tabele spodaj. Ti primeri so namenjeni prikazu, da je mogoče živali v študiji razdeliti v različne vzorce preskušanja na več različnih načinov.

Primer 1

2. Za preskušanje vedenjske ontogenije pred odstavitvijo od sesanja se uporabi ena skupina 20 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod). Od teh živali je 10 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) humano usmrčenih na PPD 22. Možgani se odstranijo, stehtajo in obdelajo za histopatološko vrednotenje. Poleg tega se zberejo podatki o teži možganov z uporabo nefiksiranih možganov preostalih 10 samcev in 10 samic na velikost odmerka.

3. Druga skupina 20 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod) se uporabi za funkcionalne/vedenjske preskuse po odstavitvi od sesanja (podrobna klinična opazovanja, preskušanja motorične aktivnosti, slušnih dražljajev in kognitivne funkcije pri adolescentih) in ocenjevanje starosti ob nastopu spolne zrelosti. Od teh živali se 10 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) anestezira in fiksira s perfuzijo ob koncu študije (približno PPD 70). Po dodatni fiksaciji *in situ* se možgani odstranijo in obdelajo za nevropatološko vrednotenje.

4. Za preskušanje kognitivne funkcije pri mladih odraslih (npr. PPD 60–70) se uporabi tretja skupina 20 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod). Od tega je 10 živali/spol/skupino (1 samec ali 1 samica na zarod) usmrčenih ob koncu študije, pri čemer se možgani odstranijo in stehtajo.

5. Preostalih 20 živali/spol/skupino se shrani za morebitne dodatne preskuse.

Tabela 1

Št. mladičev [a]		Št. mladičev, razporejenih za preskus	Pregled/preskus
m	ž		
1	5	20 m + 20 ž	Vedenjska ontogenija
		10 m + 10 ž	Teža/nevropatologija/morfometrija možganov na PPD 22
		10 m + 10 ž	Teža možganov na PPD 22
2	6	20 m + 20 ž	Podrobna klinična opazovanja
		20 m + 20 ž	Motorična aktivnost
		20 m + 20 ž	Spolna zrelost
		20 m + 20 ž	Motorična in senzorična funkcija
		20 m + 20 ž	Učenje in spominjanje (PPD 25)
		10 m + 10 ž	Teža/nevropatologija/morfometrija možganov mladih odraslih ~ PPD 70

▼**M5**

Št. mladičev ([a])		Št. mladičev, razporejenih za preskus	Pregled/preskus
m	ž		
3	7	20 m + 20 ž	Učenje in spominjanje (mladi odrasli)
		10 m + 10 ž	Teža možganov mladih odraslih ~ PPD 70
4	8	—	Preostale živali za zamenjave ali dodatne preskuse

([a]) V tem primeru se zarodi zmanjšajo na 4 samce in 4 samice, pri čemer se mladi samci označijo s številkami od 1 do 4, mlade samice pa s številkami od 5 do 8.

Primer 2

6. Za preskušanje vedenjske ontogenije pred odstavitvijo od sesanja se uporabi ena skupina 20 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod). Od teh živali je 10 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) humano usmrčenih na PPD 11. Možgani se odstranijo, stehtajo in obdelajo za histopatološko vrednotenje.

7. Druga skupina 20 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod) se uporabi za preglede po odstavitvi od sesanja (podrobna klinična opazovanja, motorična aktivnost, ocena starosti ob nastopu spolne zrelosti ter motorična in senzorična funkcija). Od teh živali se 10 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) anestezira in fiksira s perfuzijo ob koncu študije (približno PPD 70) Po dodatni fiksaciji *in situ* se možgani odstranijo, stehtajo in obdelajo za nevropatološko vrednotenje.

8. Za preskušanje kognitivne funkcije pri adolescentih in mladih odraslih se uporabi 10 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod). Za preskuse kognitivne funkcije na PPD 23 in pri mladih odraslih se uporabijo različne živali. Ob koncu se 10 živali/spol/skupino, ki se preskusijo kot odrasli, usmrti, možgani pa se odstranijo in stehtajo.

9. Preostalih 20 živali/spol/skupino, ki niso bile izbrane za preskušanje, se usmrti in izloči ob odstavitvi od sesanja.

Tabela 2

Št. mladičev ([a])		Št. mladičev, dodeljenih za preskus	Pregled/preskus
m	ž		
1	5	20 m + 20 ž	Vedenjska ontogenija
		10 m + 10 ž	Teža/nevropatologija/morfometrija možganov na PPD 11
2	6	20 m + 20 ž	Podrobna klinična opazovanja
		20 m + 20 ž	Motorična aktivnost
		20 m + 20 ž	Spolna zrelost
		20 m + 20 ž	Motorična in senzorična funkcija
		10 m + 10 ž	Teža/nevropatologija/morfometrija možganov mladih odraslih ~ PPD 70

▼**M5**

Št. mladičev ([a])		Št. mladičev, dodeljenih za preskus	Pregled/preskus
m	ž		
3	7	10 m + 10 ž ([b])	Učenje in spominjanje (PPD 23)
3	7	10 m + 10 ž ([b])	Učenje in spominjanje (mladi odrasli) Teža možganov mladih odraslih
4	8	—	Živali, usmrčene in izločene na PPD 21

([a]) V tem primeru se zarodi zmanjšajo na 4 samce in 4 samice, pri čemer se mladi samci označijo s številkami od 1 do 4, mlade samice pa s številkami od 5 do 8.
([b]) Za kognitivne preskuse na PPD 23 in pri mladih odraslih se uporabijo različne živali (npr. sodi/lihi zarodi od skupaj 20).

Primer 3

10. Za oceno teže možganov in nevropatološko oceno na PPD 11 se uporabi ena skupina 20 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod). Od teh živali je 10 mladičev/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) humano usmrčenih na PPD 11, pri čemer se možgani odstranijo, stehtajo in obdelajo za histopatološko vrednotenje. Poleg tega se zberejo podatki o teži možganov z uporabo nefiksiranih možganov preostalih 10 samcev in 10 samic na velikost odmerka.

11. Druga skupina 20 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod) se uporabi za vedenjsko ontogenijo (motorična aktivnost), preglede po odstavitvi od sesanja (motorična aktivnost in ocena starosti ob nastopu spolne zrelosti) in preskušanje kognitivne funkcije pri adolescentih.

12. Druga skupina 20 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec in 1 samica na zarod) se uporabi za preskuse motorične in senzorične funkcije (slušni dražljaji) ter podrobna klinična opazovanja. Od teh živali se 10 živali/spol/velikost odmerka (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) anestezira in fiksira s perfuzijo ob koncu študije (približno PPD 70) Po dodatni fiksaciji *in situ* se možgani odstranijo, stehtajo in obdelajo za nevropatološko vrednotenje.

13. Druga skupina 20 mladičev/spol/velikost odmerka se uporabi za preskušanje kognitivne funkcije pri mladih odraslih (tj. 1 samec in 1 samica na zarod). Od tega je 10 živali/spol/skupino (tj. 1 samec ali 1 samica na zarod) ob koncu usmrčenih, pri čemer se možgani odstranijo in stehtajo.

Tabela 3

Št. mladičev ([a])		Št. mladičev, razporejenih za preskus	Pregled/preskus
m	ž		
1	5	10 m + 10 ž	Teža/nevropatologija/morfometrija možganov na PPD 11
		10 m + 10 ž	Teža možganov na PPD 11
2	6	20 m + 20 ž	Vedenjska ontogenija (motorična aktivnost)
		20 m + 20 ž	Motorična aktivnost
		20 m + 20 ž	Spolna zrelost
		20 m + 20 ž	Učenje in spominjanje (PPD 27)

▼**M5**

Št. mladičev [a]		Št. mladičev, razporejenih za preskus	Pregled/preskus
m	ž		
3	7	20 m + 20 ž	Zvočni dražljaj (adolescenti in mladi odrasli)
		20 m + 20 ž	Podrobna klinična opazovanja
		10 m + 10 ž	Teža/nevropatologija/morfometrija možganov mladih odraslih ~ PPD 70
4	8	20 m + 20 ž	Učenje in spominjanje (mladi odrasli)
		10 m + 10 ž	Teža možganov mladih odraslih

[a] V tem primeru se zarodi zmanjšajo na 4 samce in 4 samice, pri čemer se mladi samci označijo s številkami od 1 do 4, mlade samice pa s številkami od 5 do 8.

▼**M5**

Dodatek 2

Opredelitve

Kemikalija: snov ali zmes.

Preskusna kemikalija: katera koli snov ali zmes, ki se preskuša s to preskusno metodo.

▼M5

B.54 UTEROTROPNI BIOLOŠKI PRESKUS NA GLODAVCIH: KRATKOTRAJNI PRESEJALNI PRESKUS ZA ESTROGENE LASTNOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD št. 440 (2007). OECD je leta 1998 začela z izvajanjem prednostne dejavnosti, da bi pregledala obstoječe in razvila nove smernice za odkrivanje in preskušanje potencialnih povzročiteljev endokrinih motenj (1). Ta dejavnost je med drugim zajemala razvoj smernice za preskušanje za uterotropni biološki preskus na glodavcih. Za uterotropni biološki preskus na glodavcih je bil opravljen obsežen program validacije, med drugim priprava podrobnega referenčnega dokumenta (2) (3) in izvajanje obsežnih študij znotraj laboratorija in med laboratoriji, da bi dokazali ustreznost in ponovljivost biološkega preskusa z močnim referenčnim estrogenom, šibkimi agonisti estrogenskih receptorjev, močnim antagonistom estrogenskih receptorjev in negativno referenčno kemikalijo (4) (5) (6) (7) (8) (9). Ta preskusna metoda B.54 je bila razvita na podlagi izkušenj, pridobljenih med programom validacije preskusa in dobljenih rezultatov z agonisti estrogenov.

2. Uterotropni biološki preskus je kratkotrajni presejalni preskus, ki izvira iz 30. let prejšnjega stoletja (27) (28) in ga je prvi standardiziral strokovni odbor leta 1962 (32) (35). Temelji na povečanju teže maternice ali uterotropnem odzivu (za pregled glej (29)). Vrednoti sposobnost kemikalije, da sproži biološko delovanje, ki je v skladu z agonisti ali antagonisti naravnih estrogenov (npr. 17ß-estradiol), se pa za odkrivanje antagonistov uporablja precej redkeje kot za odkrivanje agonistov. Maternica se na estrogene odziva na dva načina. Prvotni odziv je povečanje teže zaradi prepojenosti z vodo. Temu odzivu sledi povečanje teže zaradi rasti tkiva (30). Odziv maternice pri podganah in miših je kvalitativno primerljiv.

3. Ta biološki preskus služi kot presejalna študija *in vivo*, njegovo uporabo pa je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira za preskušanje in oceno kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje, 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (Dodatek 2). V tem temeljnem okviru je uterotropni biološki preskus na ravni 3 kot preskus *in vivo,* ki zagotavlja podatke o enem samem endokrinem mehanizmu, tj. estrogenosti.

4. Uterotropni biološki preskus naj bi bil vključen v sistem preskusov *in vitro* in *in vivo*, s katerimi bi opredelili kemikalije, ki bi lahko vplivale na endokrini sistem, na podlagi tega pa bi bile opravljene ocene tveganja za zdravje ljudi in okolje. V programu OECD za validacijo so bili za oceno učinkovitosti preskusa za opredelitev estrogenih kemikalij uporabljeni močni in šibki agonisti estrogenov (4) (5) (6) (7) (8). Tako sta bila uspešno dokazana občutljivost postopka preskušanja za agoniste estrogenov in zagotovljena dobra ponovljivost znotraj laboratorija in med laboratoriji.

5. V zvezi z negativnimi kemikalijami je bila v program validacije vključena samo ena 'negativna' referenčna kemikalija, ki je bila kot negativna že potrjena z uterotropnim preskusom ter *in vitro* preskusi vezave na receptorje in receptorjev, ocenjeni pa so bili tudi dodatni podatki študij, ki niso bili povezani s programom OECD za validacijo in so dodatno podprli specifičnost uterotropnega biološkega preskusa za odkrivanje agonistov estrogenov (16).

▼**M5**

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

6. Agonisti in antagonisti estrogenov delujejo kot ligandi estrogenskih receptorjev α in β in lahko pri receptorjih aktivirajo oziroma zavirajo dejavnost prepisovanja. Zato bi lahko prišlo do škodljivih učinkov za zdravje, vključno z učinki na razmnoževanje in razvoj. Zato je potrebna hitra ocena in vrednotenje kemikalije kot možnega agonista ali antagonista estrogenov. Afiniteta liganda do estrogenskega receptorja ali aktivacije prepisovanja *in vitro* je samo eden od kazalnikov morebitne nevarnosti. Drugi kazalniki so lahko aktivacija presnove in njena deaktivacija po vstopu v telo, razporeditev v tarčna tkiva in odstranitev iz telesa, vsaj delno pa so odvisni od načina vnosa in preskusne kemikalije. Zato je treba morebitno dejavnost kemikalije pod ustreznimi pogoji proučiti *in vivo*, razen če so potrebne informacije razvidne že iz lastnosti kemikalije glede absorpcije, porazdelitve, presnove in izločanja. Maternična tkiva se na stimulacijo z estrogeni odzovejo s hitro in bujno rastjo, zlasti pri laboratorijskih glodavcih, pri katerih pojatveni cikel traja približno 4 dni. Glodavci, zlasti podgane, se pogosto uporabljajo tudi v študijah strupenosti za opredelitev nevarnosti. Zato je maternica pri glodavcih ustrezen tarčni organ za presejanje agonistov in antagonistov estrogenov *in vivo*.

7. Ta preskusna metoda temelji na protokolih iz validacijske študije OECD, ki so se izkazali za zanesljive in ponovljive v študijah znotraj laboratorija in med laboratoriji (5) (7). Trenutno sta na voljo dve metodi, in sicer metoda s sterilizirano odraslo samico in metoda z nezrelo nesterilizirano samico. V programu OECD za validacijo preskusa se je izkazalo, da sta obe metodi primerljivo občutljivi in ponovljivi. Metoda z nezrelo samico je nekoliko manj specifična, ker je os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze (os HPG) nedotaknjena, vendar pokriva širše področje preiskave kot metoda s sterilizirano samico, saj se lahko pri prvi metodi žival odzove na kemikalije, ki vplivajo na os HPG in ne samo na estrogenski receptor. Delovanje osi HPG pri podgani se prične pri približno 15 dneh starosti. Pred tem pubertete ni mogoče spodbuditi s tretiranjem, na primer z GnRH. Ko samice prihajajo v puberteto, imajo pred odpiranjem nožnice več tihih ciklov, zaradi katerih sicer ne pride do odpiranja nožnice ali ovulacije, so pa prisotna hormonska nihanja. Če kemikalija os HPG neposredno ali posredno stimulira pred puberteto, pride do zgodnje ovulacije in pospešenega odpiranja nožnice. Do tega ne pride samo zaradi kemikalij, ki delujejo na os HPG; tudi nekatere vrste hrane, ki imajo višje ravni presnovljive energije kot druge, bodo stimulirale rast in spodbudile odpiranje nožnice, čeprav niso estrogenske. Takšne kemikalije ne bi povzročile uterotropnega odziva pri sterilizirani odrasli samici, saj njihova os HPG ne deluje.

8. Zaradi dobrobiti živali je zaželena uporaba metode z nezrelimi podganami, saj tako ni potrebna kirurška predpriprava živali, izogniti pa se je mogoče tudi neuporabi tistih živali, ki kažejo morebitne znake pojatvenega cikla (glej odstavek 30).

▼**M5**

9. Do uterotropnega odziva ne pride samo zaradi estrogenosti, tj. do odziva lahko pride tudi zaradi drugih kemikalij, ne samo agonistov ali antagonistov estrogenov. Do stimulativnega odziva lahko na primer pride tudi zaradi relativno velikih odmerkov progesterona, testosterona ali različnih sintetičnih progestinov (30). Vsak odziv je mogoče histološko analizirati za keratinizacijo in kornifikacijo nožnice (30). Ne glede na morebiten izvor odziva naj bi bili na podlagi pozitivnega rezultata uterotropnega biološkega preskusa običajno začeti postopki za nadaljnja pojasnila. Dodatni dokazi o estrogenosti bi bili lahko pridobljeni na podlagi preskusov *in vitro*, kot so preskusi vezave na estrogenske receptorje in preskusi aktivacije prepisovanja, ali na podlagi drugih preskusov *in vivo,* kot je preskus na podgani ženskega spola v puberteti.

10. Ob upoštevanju, da uterotropni biološki preskus služi kot presejalna študija *in vivo*, je bil pristop validacije koristen tako za vprašanja, povezana z dobrobitjo živali, kot za večstopenjsko strategijo preskušanja. Zato je bilo prizadevanje usmerjeno v strogo validacijo ponovljivosti in občutljivosti za estrogenost, kar je najpomembnejše vprašanje pri številnih kemikalijah, medtem ko v razsežnost antiestrogenosti v preskusu ni bilo vloženega veliko truda. Preskušen je bil samo en antiestrogen z močnim delovanjem, saj je število kemikalij z jasnim antiestrogenim profilom (ki ga ne prikrije kakšno estrogeno delovanje) zelo majhno. Zato je ta preskusna metoda namenjena estrogenemu protokolu, protokol, ki v preskusu opisuje antagonistično delovanje, pa je vključen v smernici (37). Ponovljivost in občutljivost preskusa za kemikalije z izključno antiestrogenim delovanjem bo jasneje opredeljena v prihodnosti, ko bo preskusni postopek že nekaj časa v uporabi in bo opredeljenih več kemikalij s tem načinom delovanja.

11. Priznava se, da morajo biti vsi postopki, pri katerih se uporabljajo živali, v skladu z lokalnimi standardi za varstvo živali; opisi oskrbe in ravnanja z živalmi v nadaljevanju so minimalni standardi, nadomestili pa jih bodo lokalni predpisi, kot je Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (38). Nadaljnje smernice o humanem ravnanju z živalmi je predložila OECD (25).

12. Kot pri vseh preskusih, pri katerih se uporabljajo žive živali, se je treba pred pričetkom izvajanja preskusa prepričati, da so podatki resnično potrebni. Na primer, dva pogoja, pri katerih so podatki potrebni, sta:

— visok potencial za izpostavljenost (raven 1 temeljnega okvira, Dodatek 2) ali pokazatelji estrogenosti (raven 2), zaradi katerih je potrebno preveriti, ali se lahko takšni učinki pojavijo *in vivo*,

— učinki, ki kažejo na estrogenost v preskusih *in vivo* na ravni 4 ali 5, da bi ugotovili, ali so bili učinki povezani z estrogenimi mehanizmi, ki jih ni mogoče pojasniti s preskusom *in vitro*.

13. Opredelitve, uporabljene v tej preskusni metodi, so navedene v Dodatku 1.

▼M5

NAČELO PRESKUSA

14. Občutljivost uterotropnega biološkega preskusa je odvisna od sistema preskušanja na živalih, pri katerem os hipotalamus – hipofiza – jajčniki ne deluje, zaradi česar so prisotne nizke endogene koncentracije cirkulirajočega estrogena. Tako se zagotovi nizka osnovna teža maternice in največji možni razpon odziva na prejete estrogene. To zahtevo izpolnjujeta dve na estrogen občutljivi stanji pri glodavcih ženskega spola:

(i) nezrele samice po odstavitvi in pred puberteto ter

(ii) mlade odrasle samice po sterilizaciji, ko je dovolj časa, da se maternična tkiva zmanjšajo.

15. Preskusna kemikalija se vnese dnevno, in sicer oralno z gavažo ali s podkožnim injiciranjem. Stopnjevani odmerki preskusne kemikalije se dajejo vsaj dvema tretiranima skupinama (za navodila glej odstavek 33) preskusnih živali, pri čemer se za vsako skupino uporabi ena velikost odmerka, in sicer v obdobju treh zaporednih dni pri metodi z nesterilizirano nezrelo samico in obdobju najmanj treh zaporednih dni pri metodi s sterilizirano odraslo samico. Približno 24 ur po prejetju zadnjega odmerka se na živalih opravi obdukcija. Pri agonistih estrogenov se na podlagi srednje teže maternice živali v tretiranih skupinah glede na nosilec oceni, ali je prišlo do statistično značilnega povečanja. Statistično značilno povečanje srednje teže maternice živali v preskusni skupini v tem biološkem preskusu pomeni pozitiven odziv.

OPIS METODE

Izbira živalskih vrst

16. Lahko se uporabijo laboratorijski sevi glodavcev, ki se običajno uporabljajo. Med validacijo so bili na primer uporabljeni sevi podgan Sprague-Dawley in Wistar. Sevi z maternicami, za katere je znano ali pa se sumi, da so manj odzivne, se ne smejo uporabiti. Laboratorij bi moral dokazati občutljivost uporabljenega seva v skladu z odstavkoma 26 in 27.

17. V uterotropnem biološkem preskusu se od 30-ih let prejšnjega stoletja običajno uporabljajo podgane in miši. Validacijske študije OECD so bile izvedene samo s podganami na podlagi prepričanja, da sta obe vrsti enakovredni, zato bi morala biti ena vrsta dovolj za globalno validacijo, da bi prihranili sredstva in živali. Podgane so prva izbira pri večini študij strupenosti za razmnoževanje in razvoj. Ker za miši obstaja obsežna zbirka preteklih podatkov, in bi tako razširili področje uporabe uterotropnega biološkega preskusa na glodavcih na uporabo miši kot preskusne vrste, je bila na miših opravljena omejena nadaljevalna validacijska študija (16). V skladu s prvotnim namenom ohranjanja sredstev in živali je bil izbran premostitveni pristop z omejenim številom preskusnih kemikalij in sodelujočih laboratorijev ter brez preskušanja kodiranih vzorcev. Ta premostitvena validacijska študija za uterotropni biološki preskus na steriliziranih mladih odraslih miših dokazuje, da se podatki, pridobljeni s podganami in mišmi, kvalitativno in kvantitativno dobro dopolnjujejo. Če bo po uterotropnem biološkem preskusu morda izvedena dolgotrajna študija, bo tako mogoče v obeh študijah uporabiti živali iste vrste, seva in izvora. Premostitveni pristop je bil uporabljen samo za sterilizirane odrasle miši, poročilo pa ne zagotavlja zanesljivih podatkov za validacijo modela z nezrelimi samicami, zato model z nezrelimi mišmi ne sodi na področje uporabe obstoječe preskusne metode.

▼M5

18. Zato se lahko v nekaterih primerih namesto podgan uporabijo miši. Uporabo te vrste je treba utemeljiti na podlagi toksikoloških, farmakokinetičnih in/ali drugih meril. Za miši bodo morda potrebne spremembe protokola. Na primer, poraba hrane pri miših glede na telesno težo je večja kot pri podganah, zato mora biti vsebnost fitoestrogena v hrani za miši manjša kot v hrani za podgane (9) (20) (22).

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

19. Vsi postopki morajo biti skladni z vsemi lokalnimi standardi za varstvo živali v laboratorijih. Ti opisi oskrbe in ravnanja z živalmi so minimalni standardi, ki jih bodo nadomestili lokalni predpisi, kot je Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (38). Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi naj bo 22 °C (z odstopanjem približno ± 3 °C). Relativna vlažnost naj bo najmanj 30 % in po možnosti naj ne presega 70 %, razen med čiščenjem prostora. Cilj je 50–60-odstotna relativna vlažnost. Osvetlitev naj bo umetna. Dnevno zaporedje osvetlitve naj bo 12 ur svetlobe, 12 ur teme.

20. Laboratorijsko prehrano in pitno vodo je treba priskrbeti *ad libitum*. Mlade odrasle živali so lahko nastanjene posamično ali pa so v kletke razvrščene v skupine po največ tri živali. Zaradi mladosti nezrelih živali je priporočljiva družabna skupinska nastanitev.

21. Znano je, da visoka vsebnost fitoestrogenov v laboratorijski prehrani povzroči tolikšno povečanje teže maternice pri glodavcih, da to vpliva na uterotropni biološki preskus (13) (14) (15). Pri nezrelih živalih lahko visoka vsebnost fitoestrogenov in presnovljiva energija v laboratorijski prehrani vplivata tudi na pojav zgodnje pubertete. Fitoestrogeni so prisotni v glavnem zaradi vsebnosti izdelkov iz soje in lucerne v laboratorijski prehrani, koncentracija fitoestrogenov v standardni laboratorijski prehrani pa se razlikuje od serije do serije (23). Telesna teža je pomembna spremenljivka, ker je z njo povezana količina zaužite hrane. Zato se lahko dejanski odmerek fitoestrogenov, zaužitih z enako prehrano, razlikuje glede na vrsto in starost (9). Pri nezrelih podganah ženskega spola je lahko poraba hrane glede na telesno težo približno dvakrat večja od porabe hrane pri steriliziranih mladih odraslih samicah. Pri mladih odraslih miših je lahko poraba hrane glede na telesno težo približno štirikrat večja od porabe hrane pri steriliziranih mladih odraslih podganah ženskega spola.

22. Rezultati uterotropnega biološkega preskusa (9) (17) (18) (19) kažejo, da je določena količina fitoestrogenov v prehrani sprejemljiva in ne zmanjša občutljivosti biološkega preskusa. Praviloma naj raven fitoestrogenov v prehrani nezrelih podganah ženskega spola sevov Sprague Dawley in Wistar (6) (9) ne bi presegla 350 μg ekvivalentov genisteina/gram laboratorijske prehrane. Takšna prehrana bi morala biti primerna tudi pri preskušanju na mladih odraslih steriliziranih podganah, ker je poraba hrane glede na telesno težo pri mladih odraslih živalih manjša v primerjavi s porabo hrane pri nezrelih živalih. Če se uporabijo odrasle sterilizirane miši ali podgane, ki so bolj občutljive na fitoestrogen, je treba upoštevati sorazmerno zmanjšanje ravni fitoestrogenov v prehrani (20). Poleg tega lahko zaradi razlik v razpoložljivi presnovni energiji iz različne prehrane pride do časovnega zamika začetka pubertete (21) (22).

▼M5

23. Pred začetkom študije je treba skrbno izbrati prehrano brez povečane vrednosti fitoestrogenov (za navodila glej (6) (9)) ali presnovljive energije, ki lahko vplivajo na rezultate (15) (17) (19) (22) (36). Zagotavljanje ustreznega delovanja sistema preskušanja, ki ga uporablja laboratorij in je določen v odstavkih 26 in 27, je pomembno za preverjanje obeh dejavnikov. Kot varovalo v skladu z dobro laboratorijsko prakso je treba za vsako serijo prehrane, uporabljene med študijo, opraviti reprezentativno vzorčenje zaradi morebitne analize vsebnosti fitoestrogenov (npr. v primeru visoke kontrolne teže maternice v primerjavi s preteklimi kontrolnimi vzorci ali nezadostnega odziva na referenčni estrogen, 17-alfa-etinilestradiol). Alikvote je treba analizirati v okviru študije ali pa jih zamrzniti pri –20 °C oziroma tako, da se vzorec pred analizo ne razgradi.

24. Nekatere vrste stelje lahko vsebujejo naravno prisotne estrogene ali antiestrogene kemikalije (na primer, znano je, da koruzni storž vpliva na cikličnost pri podganah in očitno deluje antiestrogeno). Izbrana stelja naj bi vsebovala najmanjšo možno koncentracijo fitoestrogenov.

Priprava živali

25. Preskusne živali, ki ne kažejo nobenih znakov bolezni ali fizičnih nepravilnosti, se naključno dodelijo v kontrolne in tretirane skupine. Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Živali je treba označiti z edinstvenimi oznakami. Najbolje je, da so nezrele živali med prilagajanjem do odstavitve v kletkah skupaj z materami ali nadomestnimi materami. Obdobje prilagajanja pred začetkom študije naj bi pri mladih odraslih živalih in nezrelih živalih, ki so prispele skupaj z materami ali nadomestnimi materami, trajalo približno 5 dni. Če so prispele nezrele živali, odstavljene in brez mater, bo morda potrebno krajše obdobje prilagajanja, saj naj bi se dajanje odmerkov pričelo takoj po odstavitvi (glej odstavek 29).

POSTOPEK

Preverjanje strokovnosti laboratorija

26. Za preverjanje strokovnosti laboratorija sta na voljo dve različni možnosti:

— redno preverjanje na podlagi prvotne študije osnovne pozitivne kontrole (glej odstavek 27). Vsaj vsakih 6 mesecev in vedno, ko pride do spremembe, ki bi lahko vplivala na uspešnost preskusa (npr. nova sestava prehrane, menjava osebja, ki opravlja obdukcije, menjava seva živali ali dobavitelja itd.), je treba odzivnost sistema preskušanja (živalski model) preveriti s primernim odmerkom (na podlagi študije osnovne pozitivne kontrole iz poglavja 27) referenčnega estrogena: 17α-etinilestradiol (št. CAS 57-63-6) (EE),

— uporaba sočasnih kontrolnih vzorcev z vključitvijo skupine, ki je prejela ustrezni odmerek referenčnega estrogena, v vsak preskus.

Če se sistem ne odzove v skladu s pričakovanji, je treba pogoje preskusa preveriti in ustrezno spremeniti. Priporoča se, da je odmerek referenčnega estrogena, ki bo uporabljen v obeh primerih, približno ED70 do 80.

▼M5

27. **Študija osnovne pozitivne kontrole** – Preden laboratorij prvič izvede študijo v okviru te preskusne metode, je treba dokazati strokovnost laboratorija s preskusom odzivnosti živalskega modela z določitvijo odziva na odmerek referenčnega estrogena: 17α-etinilestradiola (št. CAS 57-63-6) (EE) z najmanj štirimi odmerki. Odziv teže maternice se nato primerja z dobljenimi preteklimi podatki (glej vir (5)). Če študija osnovne pozitivne kontrole ne prinese pričakovanih rezultatov, je treba pogoje preskusa preveriti in spremeniti.

Število in stanje živali

28. Vsaka tretirana in kontrolna skupina mora vključevati vsaj 6 živali (za protokola obeh metod, tj. z nezrelo in sterilizirano odraslo samico).

Starost nezrelih živali

29. Pri uterotropnem biološkem preskusu z nezrelimi živalmi je treba opredeliti dan skotitve. Dajanje odmerkov se mora začeti dovolj zgodaj, da se ob koncu dajanja preskusne kemikalije še ne prične fiziološko naraščanje endogenih estrogenov, povezanih s puberteto. Po drugi strani pa obstajajo dokazi, da so zelo mlade živali morda manj občutljive. Pri opredelitvi optimalne starosti mora vsak laboratorij upoštevati lastne osnovne podatke o zorenju.

Na splošno se lahko dajanje odmerkov podganam prične takoj po zgodnji odstavitvi na 18. poporodni dan (dan skotitve je poporodni dan 0). Dajanje odmerkov podganam naj bi bilo končano 21. poporodni dan, vsekakor pa pred 25. poporodnim dnem, saj se po tej starosti začne delovanje osi hipotalamus – hipofiza – jajčniki, ravni endogenih estrogenov pa lahko začnejo naraščati hkrati s povprečji osnovne teže maternice in povečanjem standardnih odklonov v skupini (2) (3) (10) (11) (12).

Postopek sterilizacije

30. Pri steriliziranih podganah in miših ženskega spola (tretirane in kontrolne skupine) se sterilizacija opravi med 6. in 8. tednom starosti. Pri podganah naj bi od sterilizacije do prvega odmerka preteklo vsaj 14 dni, da se lahko maternica zmanjša na najmanjšo, stabilno osnovno težo. Pri miših naj bi od sterilizacije do prvega odmerka preteklo vsaj 7 dni. Ker za proizvodnjo velike koncentracije cirkulirajočih estrogenov (3) zadošča majhna količina materničnega tkiva, je treba pred uporabo na živalih opraviti preskus z opazovanjem epitelijskih celic, vzetih z brisom nožnice vsaj pet zaporednih dni (npr. pri podganah na 10.–14. dan po sterilizaciji). Če živali kažejo morebitne znake pojatvenega cikla, se jih ne sme uporabiti. Pri obdukciji je treba ostanke jajčnikov pregledati zaradi morebitne prisotnosti tkiva jajčnikov. Če je tkivo prisotno, se živali ne smejo uporabiti pri izračunih (3).

31. Postopek sterilizacije se prične tako, da pravilno anestezirana žival leži na trebuhu. Rez, s katerim se odpre dorzolateralno trebušno steno, naj meri približno 1 cm v dolžino na sredini med zunanjim robom reber in črevničnim grebenom ter nekaj milimetrov lateralno od lateralnega roba ledvene mišice. Jajčnik je treba iz trebušne votline prestaviti na aseptično polje. Jajčnik je treba ločiti pri stiku jajcevoda in maternice. Po potrditvi, da ni prišlo do večje krvavitve, je treba trebušno steno zapreti s šivom, kožo pa speti s sponkami ali zapreti z ustreznim šivom. Mesto ligacije je prikazano na sliki 1. Uporabiti je treba primerne pooperativne analgetike v skladu s priporočili veterinarja, ki ima izkušnje z nego glodavcev.

▼M5

Telesna teža

32. Pri metodi s sterilizirano odraslo samico telesna teža in teža maternice nista povezani, ker na težo maternice vplivajo hormoni, kot je estrogen, ne pa tudi rastni faktorji, ki vplivajo na velikost telesa. Ravno nasprotno je telesna teža povezana s težo maternice pri modelu z nezrelo samico v času dozorevanja (34). Zato naj bi bilo na začetku študije pri modelu z nezrelo samico nihanje teže uporabljenih živali čim manjše in naj ne bi preseglo ± 20 % srednje teže. To pomeni, da mora rejec standardizirati velikost zaroda in tako zagotoviti, da so potomci različnih mater približno enako hranjeni. Živali je treba razdeliti v skupine (kontrolne in tretirane) v naključnem razponu teže, tako da se povprečna telesna teža vsake skupine statistično ne razlikuje od drugih skupin. Če je mogoče, je treba paziti, da živali iz istega legla niso razporejene v isto tretirano skupino, ne da bi se zaradi tega povečalo število legel, uporabljenih v raziskavi.

Odmerjanje

33. Za ugotavljanje, ali lahko preskusna kemikalija *in vivo* deluje estrogeno, običajno zadoščajo dve skupini z odmerki in kontrola, zato je zaradi dobrobiti živali zaželen takšen način preskušanja. Če je cilj pridobiti krivuljo odziva na odmerek ali ekstrapolacija na manjše odmerke, so potrebne vsaj 3 skupine odmerkov. Če ni potrebna samo opredelitev estrogenega delovanja, ampak so potrebne tudi druge informacije (na primer ocena moči delovanja), je treba razmisliti o drugačnem režimu odmerjanja. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če je pri dajanju preskusne kemikalije uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti enako količino nosilca kot tretirane skupine (ali največjo uporabljeno količino pri preskusnih skupinah, če so količine, ki jih skupine prejmejo, različne).

34. Cilj pri uterotropnem biološkem preskusu je izbrati odmerke, ki zagotavljajo preživetje živali in zanje niso preveč strupeni oziroma jim ne povzročajo prevelike stiske po treh zaporednih dneh dajanja kemikalije, do največjega odmerka 1 000 mg/kg/d. Pri predlaganju in izbiri velikosti vseh odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o strupenosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na razpolago za preskusno kemikalijo ali sorodne snovi. Pri največjem odmerku je treba najprej upoštevati informacije o LD50 in/ali akutni strupenosti, da bi se izognili smrti, hudemu trpljenju ali stiski živali (24) (25) (26). Največji odmerek bi moral biti največji tolerančni odmerek (MTD); študija, opravljena z velikostjo odmerka, ki je povzročil pozitiven uterotropni odziv, bi bila prav tako sprejeta. Kot sito so na splošno sprejemljivi veliki intervali med odmerki (npr. polovica logaritemske enote, kar ustreza večanju odmerka za faktor 3,2, ali celo do ene logaritemske enote). Če ustrezni podatki niso na voljo, se lahko opravi študija ugotavljanja območja, s pomočjo katere se določijo odmerki za uporabo.

35. Namesto tega se lahko v primeru, ko je moč estrogenega delovanja agonista mogoče oceniti s podatki *in vitro* (ali *in silico*), pri izbiri odmerka upoštevajo ti podatki. Količina preskusne kemikalije, ki bi povzročila uterotropne odzive, enakovredne referenčnemu agonistu (etinilestradiolu), se na primer oceni z njeno relativno *in vitro* stopnjo učinkovanja glede na etinilestradiol. Največji preskusni odmerek se dobi tako, da se ta enakovredni odmerek pomnoži z ustreznim faktorjem, npr. 10 ali 100.

▼M5

Preudarki glede ugotavljanja območja

36. Po potrebi se lahko z nekaj živalmi izvede predhodna študija za ugotavljanje območja. S tem v zvezi se lahko uporabi smernica OECD št. 19 (25), ki opredeljuje klinične znake strupenosti ali stiske pri živalih. Če je to v okviru te študije za ugotavljanje območja po treh dneh dajanja odmerkov izvedljivo, se lahko maternice izreže in stehta približno 24 ur po zadnjem odmerku. Ti podatki so nato lahko v pomoč pri zasnovi glavne študije (izbira sprejemljivih največjih in manjših odmerkov ter priporočilo glede števila skupin z odmerki).

Dajanje odmerkov

37. Preskusna kemikalija se daje oralno z gavažo ali s podkožnim injiciranjem. Pri izbiri načina dajanja je treba upoštevati vprašanja, povezana z dobrobitjo živali in toksikološke vidike, kot so relevantnost za način izpostavljenosti kemikaliji pri ljudeh (npr. na podlagi dajanja oralno z gavažo se modelira izpostavljenost prek zaužitja, na podlagi podkožnega injiciranja se modelira izpostavljenost prek vdihavanja ali adsorpcije skozi kožo), fizikalne/kemijske lastnosti preskusne kemikalije in zlasti obstoječi toksikološki podatki ter podatki o presnovi in kinetiki (npr. potreba po izogibanju presnovi prvega prehoda, boljša učinkovitost določenega načina izpostavljenosti).

38. Priporoča se, da se, kadar koli je to mogoče, najprej prouči uporaba vodne raztopine/suspenzije. Ker je večina estrogenih ligandov ali njihovih metaboličnih prekurzorjev hidrofobnih, se običajno uporablja raztopina/suspenzija v olju (npr. koruznem, arašidovem, sezamovem ali oljčnem olju). Ker imajo ta olja različno vsebnost kalorij in maščob, lahko nosilec vpliva na skupni vnos presnovljive energije, zaradi česar bi morda lahko spremenil izmerjene končne točke, kot je teža maternice, zlasti pri metodi z nezrelo samico (33). Zato je treba pred začetkom študije za vsak nosilec, ki bo uporabljen, za primerjavo uporabiti kontrolne vzorce brez nosilcev. Preskusne kemikalije se lahko raztopijo v najmanjši količini 95-odstotnega etanola ali drugega primernega topila, na končno delovno koncentracijo pa razredčijo v preskusnem nosilcu. Strupene lastnosti topila morajo biti znane in preskušene v ločeni kontrolni skupini, pri kateri je uporabljeno samo topilo. Če je preskusna kemikalija stabilna, se lahko raztapljanje preskusne kemikalije pospeši s previdnim segrevanjem in močnim mehanskim delovanjem. Določiti je treba stabilnost preskusne kemikalije v nosilcu. Če je preskusna kemikalija ves čas trajanja študije stabilna, se lahko pripravi samo začetni alikvot preskusne kemikalije, nato pa se dnevno pripravljajo določene razredčine odmerkov.

39. Čas odmerjanja je odvisen od uporabljenega modela (glej odstavek 29 za model z nezrelo samico in odstavek 30 za sterilizirano odraslo samico). Nezrele podgane ženskega spola prejemajo preskusno kemikalijo dnevno tri zaporedne dni. Pri steriliziranih podganah ženskega spola se prav tako priporoča tridnevno odmerjanje, vendar je sprejemljiva tudi daljša izpostavljenost, ki lahko izboljša odkrivanje kemikalij s šibko aktivnostjo. Pri sterilizirani miši ženskega spola bi moralo pri močnih agonistih estrogenov zadoščati tridnevno dajanje odmerka, saj podaljšanje na največ sedem dni ne prinaša nobenih prednosti, vendar pa v validacijski študiji (16) ta povezava za šibke estrogene ni bila preverjena, zato bi bilo treba pri sterilizirani odrasli samici odmerjanje podaljšati na največ 7 zaporednih dni.Odmerek je treba dati vsak dan približno ob istem času. Po potrebi jih je treba prilagoditi, da bi ohranili konstantno velikost odmerka glede na telesno težo živali (npr. mg preskusne kemikalije na kg telesne teže na dan). Variabilnost preskusnega volumna na podlagi telesne teže je treba s prilagajanjem koncentracije raztopine za odmerjanje obdržati na kar najnižji ravni, da bi zagotovili konstantno količino na podlagi telesne teže pri vseh odmerkih in vseh načinih dajanja.

▼M5

40. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem dnevnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Upoštevati je treba lokalne standarde za varstvo živali, količina pa ne sme preseči 5 ml/kg telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi 10 ml/kg telesne teže.

41. Če se preskusna kemikalija daje s podkožnim injiciranjem, se daje v enkratnem dnevnem odmerku. Odmerki se dajejo na dorzoskapularnem in/ali ledvenem delu s sterilno iglo (npr. velikosti 23 ali 25) in brizgo tuberkulinko. Mesto injiciranja se lahko obrije. Morebitne izgube, uhajanje snovi na mestu injiciranja ali nepopoln vnos odmerka je treba zabeležiti. Skupna količina odmerka na podgano na dan ne sme preseči 5 ml/kg telesne teže, razdeljenih na dve mesti injiciranja, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi 10 ml/kg telesne teže.

Opazovanja

Splošna in klinična opazovanja

42. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat dnevno in pogosteje, če se kažejo znaki strupenosti. Opazovanja je najbolje opraviti vsak dan ob istih časih ob upoštevanju vrhunca pričakovanih učinkov po odmerjanju. Vse živali je treba opazovati za določitev smrtnosti, obolevnosti in splošnih kliničnih znakov, kot so spremembe vedenja, spremembe na koži, dlaki, očeh in sluznicah, pojav sekrecije in ekskrecije ter delovanje avtonomnega živčevja (npr. solzenje, piloerekcija, velikost zenic, nenavaden vzorec dihanja).

Telesna teža in poraba hrane

43. Vse živali je treba stehtati dnevno na 0,1 g natančno, in sicer tik pred začetkom tretiranja, tj. ko se živali dodeli v skupine. Izmeri se lahko tudi količina hrane, ki jo živali porabijo med obdobjem tretiranja, in sicer za vsako posamezno kletko s tehtanjem hranilnic. Rezultati glede porabe hrane se izrazijo v gramih na podgano na dan.

Seciranje in merjenje teže maternice

44. Podgane so humano usmrčene 24 ur po prejetem zadnjem odmerku. Zaželen je naključni vrstni red obdukcije po skupinah, da ne bi prišlo do napredovanja neposredno po skupinah odmerkov, kar bi lahko v manjši meri vplivalo na podatke. Cilj biološkega preskusa je merjenje teže mokre in osušene maternice. V mokri teži je zajeta maternica s tekočinami v lumnu. Osušena teža se izmeri po odstranitvi tekočin v lumnu maternice.

45. Pred seciranjem je treba pri nezrelih živalih preveriti odpiranje nožnice. Postopek seciranja se začne s prerezom trebušne stene pri sramnični zrasti. Nato je treba rog maternice in jajčnike, če so prisotni, ločiti od dorzalne trebušne stene. Sečni mehur in uretri je treba odstraniti z ventralne in lateralne strani maternice in nožnice. Brazgotinasto zarastlino med rektumom in nožnico je treba ločiti tako, da je viden stik nožničnega ustja in presredka. Maternico in nožnico se od telesa loči s prerezom nožnične stene tik nad stikom s presredkom, kot je prikazano na sliki 2. Maternico je treba od telesne stene ločiti s previdnim prerezom mezenterija maternice od točke

▼M5

pritrditve po celotni dorzolateralni dolžini vsakega roga maternice. Po odstranitvi maternice iz telesa je treba biti dovolj hiter, da ne pride do izsušitve tkiv. Izguba teže zaradi izsušitve je pomembnejša pri majhnih tkivih, kot je maternica (23). Če so jajčniki prisotni, jih je treba ločiti pri jajcevodu in paziti, da ne pride do izgube tekočine iz lumna roga maternice. Če je bila žival sterilizirana, je treba ostanke jajčnikov pregledati zaradi morebitne prisotnosti tkiva jajčnikov. Odstraniti je treba odvečno maščobo in vezno tkivo. Nožnico je treba od maternice ločiti tik pod maternično vratom, tako da vrat ostane pritrjen na maternico, kot je prikazano na sliki 2.

46. Maternice je treba posamično prenesti v edinstveno označeno in stehtano posodo (npr. petrijevko ali plastično posodo za tehtanje), pri čemer je treba še vedno paziti, da pred tehtanjem ne pride do izsušitve (npr. v posodo se lahko na primer odloži filtrirni papir, rahlo navlažen z raztopino vode in soli). Maternico s tekočino v lumnu se stehta na 0,1 mg natančno (mokra teža maternice).

47. Vsako posamezno maternico je treba nato posamično obdelati in odstraniti tekočino iz lumna. Oba roga maternice se vzdolžno prebodeta ali prerežeta. Maternica se odloži na rahlo navlažen filtrirni papir (npr. Whatman št. 3) in nežno stisne z drugim kosom rahlo navlaženega filtrirnega papirja, da se popolnoma odstrani tekočina iz lumna. Maternica brez tekočine iz lumna se stehta na 0,1 mg natančno (osušena teža maternice).

48. S podatki o teži maternice ob usmrtitvi se je mogoče prepričati, da primerna starost nezrele nesterilizirane podgane ni bila presežena, vendar so glede tega odločilni pretekli podatki o sevu podgan, ki ga je uporabil laboratorij (glej odstavek 56 za razlago rezultatov).

Neobvezne preiskave

49. Po tehtanju se lahko maternica fiksira v 10-odstotnem nevtralnem formalinskem pufru in se po barvanju s hematoksilinom in eozinom histopatološko pregleda. Skladno s tem se lahko pregleda tudi nožnica (glej odstavek 9). Poleg tega se lahko za kvantitativno primerjavo opravi tudi morfometrično merjenje povrhnjice endometrija.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

50. Podatki študije morajo obsegati:

— število posameznih živali na začetku preskusa,

— število in identiteto živali, najdenih poginulih med preskusom ali usmrčenih iz humanih razlogov ter datum in čas pogina ali humane usmrtitve,

— število in identiteto živali, ki kažejo znake strupenosti in opis znakov zaznane strupenosti, vključno s časom začetka, trajanja in resnosti morebitnih strupenih učinkov, in

— število in identiteto živali, pri katerih so vidne poškodbe, ter opis vrste poškodb.

▼**M5**

51. Zabeležiti je treba podatke za posamezne živali, in sicer njihovo telesno težo, mokro težo maternice ter osušeno težo maternice. Za ugotavljanje, ali se je zaradi odmerjanja preskusne kemikalije teža maternice statistično značilno povečala ($p < 0,05$), je treba uporabiti enostranske statistične analize za agoniste. Izvesti je treba ustrezne statistične analize za ugotavljanje sprememb v osušeni in mokri teži maternice zaradi prejemanja odmerkov. Podatki se lahko na primer ovrednotijo z analizo kovariance (ANCOVA), pri čemer je telesna teža pri obdukciji kovariat. Pred analizo podatkov se lahko za podatke o maternici izvede logaritemska pretvorba podatkov za stabilizacijo varianc. Dunnettov in Hsujev preskus sta primerna za primerjave po parih vsake skupine, ki je prejela odmerek, s kontrolnimi vzorci, ki so prejemali le nosilec, in izračun intervalov zaupanja. Grafi studentiziranih ostankov se lahko uporabijo za odkrivanje morebitnih osamelcev in oceno homogenosti varianc. Ti postopki so bili uporabljeni v programu OECD za validacijo z metodo PROC GLM v sistemu za statistično analizo (SAS Institute, Cary, Severna Karolina, ZDA), različica 8 (6) (7).

52. Končno poročilo mora vključevati naslednje podatke:

Preskuševalni laboratorij:

— pristojno osebje in njihove pristojnosti v zvezi s študijo,

— podatke preskusa osnovne pozitivne kontrole in periodične podatke o pozitivni kontroli (glej odstavka 26 in 27).

Preskusna kemikalija:

— opredelitev preskusnih kemikalij,

— agregatno stanje in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti,

— metodo in pogostost priprave razredčin,

— morebitne podatke o stabilnosti,

— morebitne analize raztopin za odmerjanje.

Nosilec:

— opredelitev nosilca (stanje, dobavitelj in št. serije),

— utemeljitev izbire nosilca (če ta ni voda).

Preskusne živali:

— vrsto in sev ter utemeljitev izbire,

— dobavitelja in določeni objekt dobavitelja,

— starost ob dobavi z datumom kotitve,

— pri nezrelih živalih podatek, ali so prispele skupaj z materami ali nadomestnimi materami, in datum odstavitve,

— podrobnosti postopka prilagajanja živali,

— število živali na posamezno kletko,

— podrobnosti in metodo edinstvenih oznak živali in skupin.

Preskusni pogoji:

— podrobnosti postopka randomizacije (tj. uporabljenega postopka),

— utemeljitev izbire odmerka,

▼M5

— podrobne podatke o formulaciji preskusne kemikalije, njeni doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti,

— podrobne podatke o dajanju preskusne kemikalije in utemeljitev izbire načina izpostavljenosti,

— prehrano (ime, vrsto, dobavitelja, vsebino in, če so znane, ravni fitoestrogenov),

— izvor vode (npr. voda iz pipe ali filtrirana voda) in njena dobava (pretakanje iz velike posode, v steklenicah itd.),

— steljo (ime, vrsto, dobavitelja, vsebino),

— evidenco o pogojih v kletkah, intervalih osvetlitve, sobni temperaturi in vlažnosti, čiščenju prostora,

— podroben opis postopka obdukcije in tehtanja maternice,

— opis statističnih podatkov.

Rezultati:

Za posamezne živali:

— vse dnevne telesne teže posameznih živali (od dodelitve v skupine do obdukcije) (na 0,1 g natančno),

— starost vsake posamezne živali (v dneh, pri čemer je dan skotitve dan 0) ob pričetku dajanja preskusne kemikalije,

— datum in čas dajanja vsakega odmerka,

— izračunani volumen in dan odmerek ter opažanja glede morebitne izgube odmerka med dajanjem odmerka ali po njem,

— dnevno evidenco stanja živali, vključno z zadevnimi simptomi in opažanji,

— domnevni vzrok pogina (če je žival med študijo najdena umirajoča ali poginula),

— datum in čas humane usmrtitve z navedbo časa, preteklega od zadnjega odmerka,

— mokro težo maternice (na 0,1 mg natančno) ter morebitna opažanja glede izgube tekočine iz lumna med seciranjem in pripravo na tehtanje,

— osušeno težo maternice (na 0,1 mg natančno).

Za vsako skupino živali:

— srednje dnevne telesne teže (na 0,1 g natančno) in standardne odklone (od dodelitve v skupine do obdukcije),

— srednje mokre teže maternic in povprečne osušene teže maternic (na 0,1 mg natančno) in standardne odklone,

— če je izmerjena, dnevno porabo hrane (izračunano kot grami porabljene hrane na žival),

▼M5

— rezultate statističnih analiz, ki primerjajo mokre in osušene teže maternic tretiranih skupin glede na enake meritve v kontrolnih skupinah z nosilcem,

— rezultate statističnih analiz, ki primerjajo skupno telesno težo in pridobljeno težo tretiranih skupin glede na enake meritve v kontrolnih skupinah z nosilcem.

53. Povzetek pomembnih smernic preskusne metode

	Podgana	**Miš**
Živali		
Sev	Običajno uporabljeni laboratorijski sevi glodavcev	
Število živali	Najmanj 6 živali na skupino odmerka	
Število skupin	Najmanj 2 preskusni skupini (za navodila glej odstavek 33) in negativna kontrolna skupina Za navodila glede pozitivnih kontrolnih skupin glej odstavka 26 in 27	
Nastanitveni in prehranjevalni pogoji		
T° v prostoru z živalmi	22 °C ± 3 °C	
Relativna vlažnost	50–60 % in ne manj kot 30 % ali več kot 70 %	
Dnevno zaporedje osvetlitve	12 ur svetlobe, 12 ur teme	
Prehrana in pitna voda	Ad libitum	
Nastanitev	Posamično ali v skupinah po največ tri živali (pri nezrelih živalih se priporoča družabna skupinska nastanitev)	
Prehrana in stelja	Za prehrano in steljo priporočena nizka raven fitoestrogenov	
Protokol		
Metoda	Metoda z nezrelo nesterilizirano samico (zaželena) Metoda s sterilizirano odraslo samico	Metoda s sterilizirano odraslo samico
Starost nezrelih živali ob odmerjanju	Ne prej kot 18. poporodni dan. Dajanje odmerkov je treba zaključiti pred 25. poporodnim dnem.	V okviru področja uporabe obstoječe preskusne metode ni relevantna.
Starost ob sterilizaciji	Med 6. in 8. tednom starosti	
Starost steriliziranih živali ob odmerjanju	Od sterilizacije do prvega dne dajanja odmerka bi moralo preteči vsaj 14 dni.	Od sterilizacije do prvega dne dajanja odmerka bi moralo preteči vsaj 7 dni.
Telesna teža	Nihanje telesne teže naj bo čim manjše in naj ne preseže ± 20 % srednje teže.	

▼M5

	Podgana	Miš
Odmerjanje		
Način dajanja	Oralno z gavažo ali s podkožnim injiciranjem	
Pogostost dajanja	Enkratni dnevni odmerek	
Prostorninski delež za gavažo in injiciranje	≤ 5 ml/kg telesne teže (ali do največ 10 ml/kg telesne teže pri vodnih raztopinah) (na dveh mestih injiciranja pri dajanju podkožno)	
Trajanje odmerjanja	3 zaporedne dni pri modelu z nezrelo samico Najmanj 3 zaporedne dni pri modelu s sterilizirano odraslo samico	7 zaporednih dni pri modelu s sterilizirano odraslo samico
Čas obdukcije	Približno 24 ur po zadnjem odmerku	
Rezultati		
Pozitiven odziv	Statistično značilno povečanje povprečne teže maternice (mokre in/ali osušene)	
Referenčni estrogen	17α-etinilestradiol	

SMERNICE ZA RAZLAGO IN PRIZNAVANJE REZULTATOV

54. Na splošno se lahko preskus za estrogenost šteje za pozitivnega, če vsaj pri največjem odmerku pride do statistično značilnega povečanja teže maternice ($p < 0,05$) v primerjavi s kontrolno skupino, pri kateri je uporabljeno le topilo. Pozitiven rezultat je nadalje podprt s prikazom biološko verjetnega razmerja med odmerkom in stopnjo odziva ob upoštevanju, da lahko estrogene in antiestrogene dejavnosti preskusne kemikalije, ki se prekrivajo, vplivajo na obliko krivulje odziva na odmerek.

55. Da bi bila mogoča smiselna razlaga podatkov, je treba paziti, da se ne preseže največji tolerančni odmerek. Zmanjšanje telesne teže, klinične znake in druge ugotovitve je treba temeljito ovrednotiti.

56. Pomemben dejavnik za priznavanje podatkov, zbranih z uterotropnim biološkim preskusom, so teže maternic živali v kontrolni skupini z nosilcem. Visoke kontrolne vrednosti lahko ogrozijo odzivnost biološkega preskusa in zmožnost odkrivanja zelo šibkih agonistov estrogenov. Na podlagi pregleda literature in podatkov, zbranih med validacijo uterotropnega biološkega preskusa, je mogoče ugotoviti, da se visoke povprečne kontrolne vrednosti lahko pojavijo tudi spontano, zlasti pri nezrelih živalih (2) (3) (6) (9). Ker je teža maternice pri nezrelih podganah odvisna od številnih spremenljivk, kot so sev ali telesna teža, zgornje meje za težo maternice ni mogoče določiti. Načeloma velja, da je treba rezultate obravnavati kot sumljive, če so teže osušenih maternic pri nezrelih podganah iz kontrolne skupine med 40 in 45 mg, zaradi tež maternic nad 45 mg pa bo morda treba ponoviti preskus. Vendar je treba takšne primere obravnavati posamično (3) (6) (8). Pri preskušanju na odraslih podganah po nepopolni sterilizaciji ostane prisotno tkivo jajčnikov, ki lahko proizvaja endogeni estrogen in zavira zmanjševanje teže maternice.

▼**M5**

57. Da bi bili rezultati sprejemljivi, mora osušena kontrolna teža maternice tehtati manj kot 0,09 % telesne teže pri nezrelih podganah ženskega spola in manj kot 0,04 % pri steriliziranih mladih odraslih samicah (glej tabelo 31 (2)). Če so kontrolne teže maternic večje, je treba proučiti različne dejavnike, tudi starost živali, fitoestrogene v prehrani in druge, negativen rezultat preskusa (ni pokazateljev estrogenega delovanja) pa je treba uporabljati previdno.

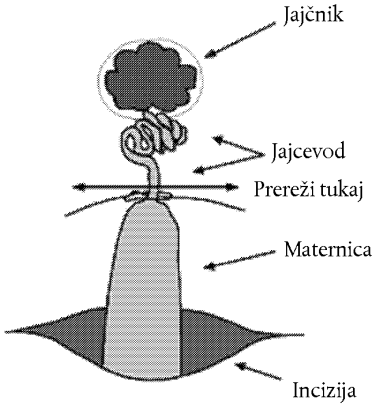
58. Pretekli podatki kontrolnih skupin z nosilcem naj bodo shranjeni v laboratoriju. Pretekli podatki za odzive na pozitivne referenčne estrogene, kot je 17α-etinilestradiol, naj bodo prav tako shranjeni v laboratoriju. Laboratoriji lahko preskušajo tudi odziv na znane šibke agoniste estrogenov. Zaradi zagotavljanja, da se z metodami laboratorija pridobi zadostna občutljivost, se lahko vsi ti podatki primerjajo z razpoložljivimi podatki (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8).

59. V validacijski študiji OECD se je pri mokrih težah maternic pojavljala večja variabilnost kot pri osušenih težah maternic (6) (7). Vendar pa bi značilen odziv v kateri koli od obeh meritev pomenil, da je preskusna kemikalija pozitivna za estrogeno delovanje.

60. Do uterotropnega odziva ne pride samo zaradi estrogenov, vendar je treba pozitiven rezultat uterotropnega biološkega preskusa na splošno razlagati kot dokaz za estrogeni potencial *in vivo* in na njegovi podlagi običajno začeti postopke za nadaljnja pojasnila (glej odstavek 9 in temeljni okvir ‘OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals’, Priloga 2).

Slika 1

Shema s prikazom kirurške odstranitve jajčnikov



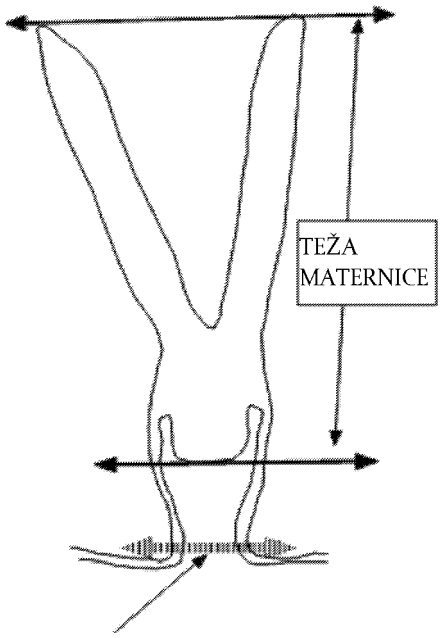
Mezometrij, žilje in maščobna blazinica niso prikazani

Postopek se prične s prerezom dorzolateralne trebušne stene na sredini med zunanjim robom reber in črevničnim grebenom ter nekaj milimetrov lateralno od lateralnega roba ledvene mišice. V trebušni votlini je treba poiskati jajčnike. Jajčnike je nato treba na aseptičnem polju fizično odstraniti iz trebušne votline, za omejitev krvavitve namestiti ligaturo med jajčnik in maternico ter jajčnik odstraniti z rezom pri stiku jajcevoda in obeh rogov maternice. Po potrditvi, da ni prišlo do večje krvavitve, je treba trebušno steno zapreti s šivom, kožo pa speti s sponkami ali zapreti s šivom. Pred uporabo je treba živalim dati vsaj 14 dni, da si opomorejo in da se teža maternice zmanjša.

▼**M5**

Slika 2

Odstranitev in priprava materničnih tkiv za merjenje teže



Postopek se začne s prerezom trebušne stene pri sramnični zrasti. Nato je treba oba jajčnika, če sta prisotna, in rog maternice ločiti od dorzalne trebušne stene. Sečni mehur in uretri je treba odstraniti z ventralne in lateralne strani maternice in nožnice. Brazgotinasto zarastlino med rektumom in nožnico je treba ločiti tako, da je viden stik nožničnega ustja in presredka. Maternico in nožnico se od telesa loči s prerezom nožnične stene tik nad stikom s presredkom, kot je prikazano na sliki. Maternico je treba od telesne stene ločiti s previdnim prerezom mezenterija maternice od točke pritrditve po celotni dorzolateralni dolžini vsakega roga maternice. Po odstranitvi iz telesa je treba odstraniti odvečno maščobo in vezno tkivo. Če so jajčniki prisotni, jih je treba ločiti pri jajcevodu in paziti, da ne pride do izgube tekočine iz lumna roga maternice. Če je bila žival sterilizirana, je treba ostanke jajčnikov pregledati zaradi morebitne prisotnosti tkiva jajčnikov. Nožnico je treba od maternice ločiti tik pod materničnim vratom, tako da vrat ostane pritrjen na maternico, kot je prikazano na sliki. Maternica se nato lahko stehta.

▼M5

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV:

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da v organizmu sesalca zavre delovanje estradiola 17ß.

Kemikalija je snov ali zmes.

Datum skotitve je poporodni dan 0.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostost in trajanje dajanja odmerka.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Pri uterotropnem biološkem preskusu je odmerek izražen kot teža preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan).

Največji tolerančni odmerek (MTD) je največja količina kemikalije, ki po vstopu v telo ne ubije preskusnih živali (označen z LD_0) (IUPAC, 1993).

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da v organizmu sesalca deluje kot estradiol 17ß.

Poporodni dan N je N-ti dan življenja po dnevu skotitve.

Občutljivost je delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. To je merilo natančnosti za preskusno metodo, s katero se dosežejo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode.

Specifičnost je delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. To je merilo natančnosti za preskusno metodo, s katero se dosežejo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode.

Preskusna kemikalija pomeni vsako snov ali zmes, preskušeno s to preskusno metodo.

Uterotropni je izraz, ki se uporablja za opis pozitivnega vpliva na rast maternič-nih tkiv.

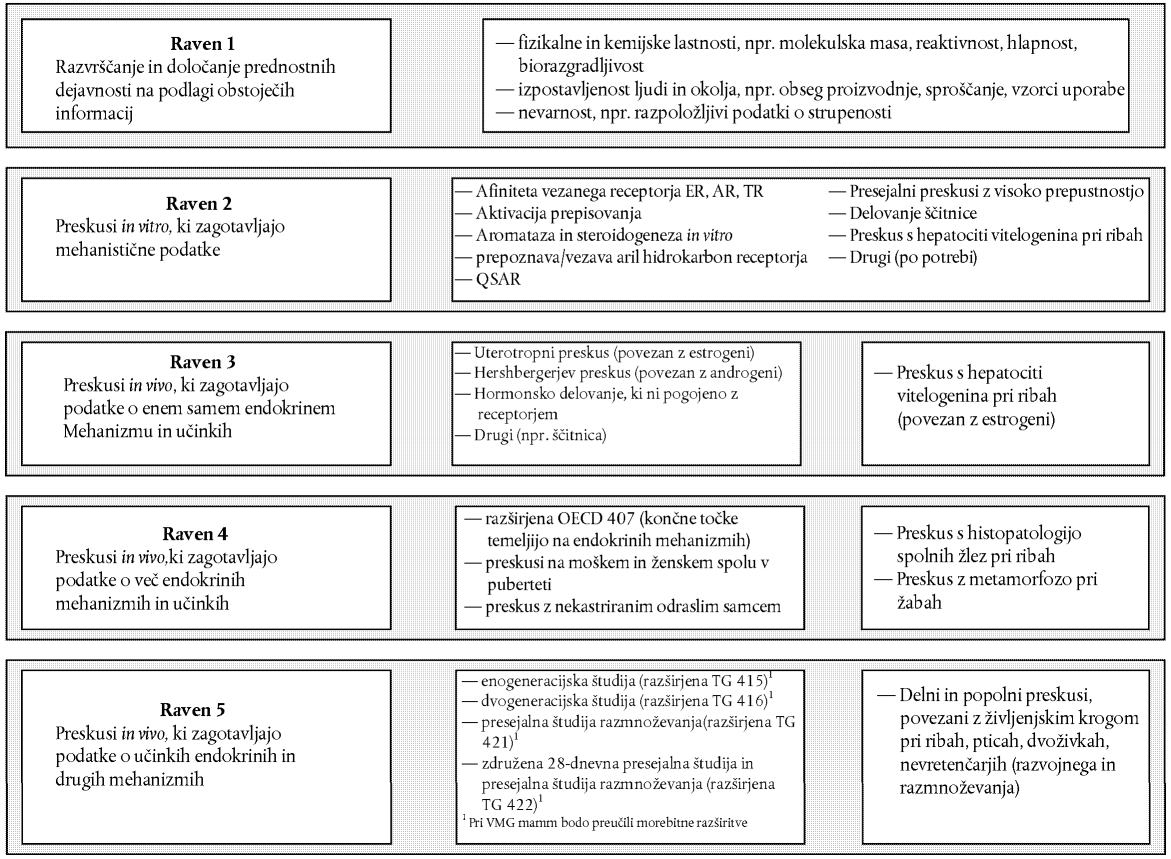
Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delo-vanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustrez-nosti za določen namen.

▼M5

Dodatek 2

Opomba: Dokument je pripravil sekretariat programa preskusnih smernic na podlagi sporazuma, sprejetega na 6. srečanju delovne skupine za EDTA.

Temeljni okvir OECD za preskušanje in oceno kemikalij, ki motijo delovanje endokrinih žlez



VMG mamm: Skupina za upravljanje validacije na področju preskusov na sesalcih in njihovega ocenjevanja.

▼**M5**

OPOMBE K OKVIRU:

Opomba 1: Vstop na vseh ravneh in izstop z vseh ravni je mogoč in odvisen od obstoječih potreb po informacijah za namene ocene nevarnosti in tveganja.

Opomba 2: Na ravni 5 bi moral ekotoksikološki vidik vključevati končne točke, ki kažejo na mehanizme škodljivih učinkov in morebitno škodo za populacijo.

Opomba 3: Če večmodalni model zajema več preskusov ene končne točke, ta model zamenja uporabo teh preskusov ene končne točke.

Opomba 4: Kemikalije je treba ocenjevati vsako posebej in pri tem upoštevati razpoložljive informacije ter funkcijo ravni okvira.

Opomba 5: V času nastanka tega dokumenta okvir še ni izpopolnjen. Na ravneh 3, 4 in 5 vključuje preskuse, ki so na voljo ali pa še v postopku validacije. Slednji so vključeni začasno. Ko bodo razviti in validirani, bodo uradno dodani v okvir.

Opomba 6: Za raven 5 se ne sme šteti, da vključuje samo končne preskuse. Preskusi, vključeni na tej ravni, prispevajo k splošni oceni nevarnosti in tveganja.

▼M5

VIRI

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}–11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens J.W., Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J., Onyon L., Haseman J., Fenner-Crisp P., Ashby J., Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J., Onyon L., Peddada S., Ashby J., Jacob E., Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530–1549

(8) Kanno J., Onyon L., Peddada S., Ashby J., Jacob E., Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550–1558.

(9) Owens W., Ashby J., Odum J., Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559–1567.

(10) Ogasawara Y., Okamoto S., Kitamura Y., Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.

(11) Branham W.S., Sheehan D.M., Zehr D.R., Ridlon E., Nelson C.J. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229–2237.

(12) Schlumpf M., Berger L., Cotton B., Conscience-Egli M., Durrer S., Fleischmann I., Haller V., Maerkel K., Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.

(13) Zarrow M.X., Lazo-Wasem E.A., Shoger R.L. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.

(14) Drane H.M., Patterson D.S.P., Roberts B.A., Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec. 106:369–373.

▼**M5**

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen G.H., Janning P., Diel P., Bolt H.M. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145–157.

(18) Wade M.G., Lee A., McMahon A., Cooke G., Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517–1525.

(19) Yamasaki K., Sawaki M., Noda S., Wada T., Hara T., Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613–620.

(20) Thigpen J.E., Haseman J.K., Saunders H.E., Setchell K.D.R., Grant M.F., Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477–485.

(21) Ashby J., Tinwell H., Odum J., Kimber I., Brooks A.N., Pate I., Boyle C.C. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol. 20:343–347.

(22) Thigpen J.E., Lockear J., Haseman J., Saunders H.E., Caviness G, Grant M.F., Forsythe D.B. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381–393.

(23) Thigpen J.E., Li L.-A., Richter C.B., Lebetkin E.H., Jameson C.W. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci. 37:596–601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33–41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288–305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284–291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401–416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1–2): 159–184.

(35) Booth A.N., Bickoff E.M. and Kohler G.O. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807–1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

▼M5

B.55 HERSHBERGERJEV BIOLOŠKI PRESKUS NA PODGANAH: KRATKOTRAJNI PRESEJALNI PRESKUS ZA (ANTI)ANDROGENE LASTNOSTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD št. 441 (2009). OECD je leta 1998 začela z izvajanjem prednostne dejavnosti, da bi pregledala obstoječe in razvila nove smernice za odkrivanje in preskušanje potencialnih povzročiteljev endokrinih motenj (1). Ta dejavnost je med drugim zajemala razvoj smernic za preskušanje za Hershbergerjev biološki preskus na podganah. Farmacevtska industrija je ta preskus uporabljala več desetletij, prvič pa ga je leta 1962 standardiziral uradni strokovni odbor kot presejalni preskus za androgene kemikalije (2). V obdobju 2001–2007 je bil za Hershbergerjev biološki preskus na podganah opravljen obsežen program validacije, med drugim priprava dokumenta o pregledu ozadja metode (23) in dokumenta z zbirko podrobnih metod (3), razvoj priročnika za seciranje (21) in izvajanje obsežnih študij znotraj laboratorija in med laboratoriji, da bi dokazali zanesljivost in ponovljivost biološkega preskusa. V teh validacijskih študijah so bili uporabljeni močan referenčni androgen (testosteron propionat (TP)), dva močna sintetična androgena (trenbolon acetat in metil testosteron), močan antiandrogen farmacevtski proizvod (flutamid), močan zaviralec sinteze (finasterid) naravnega androgena (dihidrotestosteron – DHT), več šibko antiandrogenih pesticidov (linuron, vinklozolin, procimidon, p,p' DDE), močan zaviralec 5α-reduktaze (finasterid) in dve znani negativni kemikaliji (dinitrofenol in nonilfenol) (4) (5) (6) (7) (8). Ta preskusna metoda je bila razvita na podlagi dolgoletnih izkušenj z biološkim preskusom ter izkušenj, pridobljenih med validacijo programa preskusa in dobljenih rezultatov.

2. Hershbergerjev biološki preskus je kratkotrajna presejalna študija *in vivo*, pri kateri se uporabljajo pomožna tkiva moškega reproduktivnega trakta. Izvajanje preskusa se je začelo v 30. letih prejšnjega stoletja, v 40. letih prejšnjega stoletja pa so bile vanj vključene tudi mišice v moškem reproduktivnem traktu, ki so odzivne na androgene (2) (9–15). V 60. letih prejšnjega stoletja je bilo s standardizirano različico protokola (2) (14) ocenjenih več kot 700 možnih androgenov in v tem obdobju je uporaba preskusa za androgene in antiandrogene veljala za standardno metodo (2) (15). Ta biološki preskus temelji na spremembi teže petih od androgenov odvisnih tkiv pri kastrirani podgani moškega spola v obdobju okrog pubertete. Ocenjuje sposobnost kemikalije, da sproži biološko delovanje, ki je tipično povezano z agonisti ali antagonisti androgenov oziroma zaviralci 5α-reduktaze. Pet od androgenov odvisnih tarčnih tkiv, ki so vključena v to preskusno metodo, je: ventralna prostata (VP), semenski mešiček (SM) (skupaj s tekočinami in koagulacijskimi žlezami), mišica levator ani z bulbokavernozno mišico (LABC), Cowperjevi žlezi (COW) in glavica penisa (GP). Pri kastrirani podgani moškega spola v obdobju okrog pubertete se teh pet tkiv na androgene odzove s povečanjem absolutne teže. Ko so ta tkiva stimulirana k povečanju teže z dajanjem močnega referenčnega androgena, se vseh pet tkiv na antiandrogene odzove z zmanjšanjem absolutne teže. Primarni model za Hershbergerjev biološki preskus je kirurško kastriran samec v obdobju okrog pubertete, kar je bilo validirano v fazi 1, 2 in 3 programa validacije Hershbergerjevega preskusa.

3. Hershbergerjev biološki preskus služi kot mehanistična presejalna študija *in vivo* za agoniste androgenov, antagoniste androgenov in zaviralce 5α-reduktaze, njegovo uporabo pa je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira OECD za preskušanje in oceno povzročiteljev endokrinih motenj, 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (Dodatek 2). V tem temeljnem okviru je Hershbergerjev biološki preskus na ravni 3 kot preskus *in vivo,* ki zagotavlja podatke o enem samem endokrinem mehanizmu, tj. (anti)androgenosti. Vključen naj

▼M5

bi bil v sistem preskusov *in vitro* in *in vivo*, s katerimi bi opredelili kemikalije, ki bi lahko vplivale na endokrini sistem, na podlagi tega pa bi bile opravljene ocene nevarnosti in tveganja za zdravje ljudi in okolje.

4. Zaradi prizadevanj za dobrobit živali v zvezi s postopkom kastracije je bil kot alternativni model za Hershbergerjev biološki preskus uporabljen nekastriran stimuliran odstavljen samec, da bi se izognili kastraciji. Preskusna metoda s stimuliranim odstavljenim mladičem je bila validirana (24), v validacijskih študijah pa Hershbergerjev biološki test z odstavljenim mladičem pri preskušenih odmerkih ni dosledno odkrival učinkov šibkih antiandrogenov na težo organov, odvisnih od androgenov. Zato v to preskusno metodo ni bil vključen. Ker pa lahko uporaba te metode pripomore k dobrobiti živali in zagotovi informacije o drugih načinih delovanja, je vključena v Smernico OECD št. 115 (25).

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

5. Agonisti in antagonisti androgenov delujejo kot ligandi androgenskega receptorja in lahko aktivirajo oziroma zavirajo gensko prepisovanje, ki ga receptor nadzira. Poleg tega nekatere kemikalije zavirajo pretvorbo testosterona v močnejši naravni androgen dihidrotestosteron v nekaterih tarčnih tkivih androgenov (zaviralci 5α-reduktaze). Zaradi takšnih kemikalij bi lahko prišlo do škodljivih učinkov za zdravje, vključno z učinki na razmnoževanje in razvoj. Zato obstaja regulativna potreba po hitri oceni in vrednotenju kemikalije kot možnega agonista ali antagonista androgenov ali zaviralca 5α-reduktaze. Afiniteta liganda do androgenskega receptorja, ki jo izmeri vezavni receptor ali aktivacije prepisovanja markerskih genov *in vitro,* ni edini kazalnik morebitne nevarnosti. Drugi kazalniki vključujejo aktivacijo presnove in njeno deaktivacijo po vstopu v telo, razporeditev kemikalij v tarčna tkiva in odstranitev iz telesa. Zato je treba morebitno dejavnost kemikalije pregledati *in vivo* pod ustreznimi pogoji in izpostavljenostjo. Vrednotenje *in vivo* je manj kritično, če so znane lastnosti kemikalije glede absorpcije, porazdelitve, presnove in izločanja. Od androgenov odvisna tkiva se na stimulacijo z androgeni odzovejo s hitro in bujno rastjo, zlasti pri kastriranih podganah moškega spola v obdobju okrog pubertete. Glodavci, zlasti podgane, se pogosto uporabljajo tudi v študijah strupenosti za opredelitev nevarnosti. Zato je različica preskusa s kastrirano podgano moškega spola v obdobju okrog pubertete, pri kateri se uporabi pet tarčnih tkiv, primerna za iskanje agonistov androgenov, antagonistov androgenov in zaviralcev 5α-reduktaze *in vivo*.

6. Ta preskusna metoda temelji na protokolih iz validacijske študije OECD, ki so se izkazali za zanesljive in ponovljive v študijah znotraj laboratorija in med laboratoriji (4) (5) (6) (7) (8). V tej preskusni metodi sta predstavljena postopka z androgenom in antiandrogenom.

7. Čeprav je bilo nekaj razlik v odmerku testosteron propionata, ki so ga različni laboratoriji v programu OECD za validacijo Hershbergerjevega bioloških preskusa uporabili za odkrivanje antiandrogenov (0,2 proti 0,4 mg/kg/d, podkožno injiciranje), med tema dvema različicama protokola ni bilo velike razlike glede zmožnosti zaznavanja šibkega ali močnega antiandrogenega delovanja. Jasno je, da odmerek testosteron propionata ne sme biti tako velik, da bi blokiral učinke šibkih antagonistov androgenskega receptorja (AR) ali tako majhen, da bi se androgena tkiva odzvala z majhno rastjo tudi brez sočasne uporabe antiandrogena.

▼M5

8. Posamezna od androgenov odvisna tkiva ne rastejo samo zaradi androgenov, tj. na težo nekaterih tkiv lahko vplivajo tudi druge kemikalije, ne samo agonisti androgenov. Vendar rast več tkiv hkrati dokazuje mehanizem, bolj značilen za androgene. Veliki odmerki močnih estrogenov lahko na primer vplivajo na povečanje teže semenskih mešičkov, druga od androgenov odvisna tkiva v preskusu pa se ne odzovejo na podoben način. Antiandrogene kemikalije lahko delujejo kot antagonisti androgenskega receptorja ali zaviralci 5α-reduktaze. Zaviralci 5α-reduktaze imajo različne učinke, ker je pretvorba v močnejši dihidrotestosteron različna od tkiva do tkiva. Antiandrogeni, ki zavirajo 5α-reduktazo, na primer finasterid, imajo v primerjavi z močnim antagonistom AR, kot je flutamid, izrazitejše učinke na ventralno prostato kot na druga tkiva. Ta razlika med odzivi tkiv se lahko uporabi za razlikovanje med načinom delovanja, pogojenim z androgenskim receptorjem, in načinom delovanja, pogojenim s 5α-reduktazo. Poleg tega je androgenski receptor evolucijsko povezan z receptorjem za druge steroidne hormone, nekateri drugi hormoni pa lahko pri velikih, suprafizioloških odmerkih vežejo in zavirajo učinke testosteron propionata, ki pospešujejo rast (13). Verjetno je tudi, da bi lahko povečana presnova steroidov in posledično znižanje serumskega testosterona vplivalo na manjšo rast od androgenov odvisnih tkiv. Zato je treba pozitiven rezultat Hershbergerjevega biološkega preskusa običajno oceniti na podlagi analize, ki temelji na pristopu tehtnosti dokazov, vključno s preskusi *in vitro*, kot so preskusi vezave na androgenske in estrogenske receptorje (AR in ER) ter ustreznimi preskusi aktivacije prepisovanja, ali na podlagi drugih preskusov *in vivo*, ki proučujejo podobna tarčna tkiva androgenov, kot so preskus na samcu v puberteti, 15-dnevni preskus na nekastriranem odraslem samcu ali 28-dnevne oziroma 90-dnevne študije s ponavljajočimi se odmerki.

9. Izkušnje kažejo, da so ksenobiotični antiandrogeni pogostejši od ksenobiotičnih androgenov. Zato se pričakuje, da se bo Hershbergerjev biološki preskus najpogosteje uporabljal za odkrivanje antiandrogenov. Postopek preskušanja za androgene pa bi bilo mogoče priporočiti za steroidne ali steroidom podobne kemikalije oziroma kemikalije, pri katerih pokazatelj morebitnih androgenih učinkov izhaja iz metod na ravni 1 ali 2 temeljnega okvira (Dodatek 2). Podobno lahko pri preskusih na ravni 5 opazimo prisotnost škodljivih učinkov, povezanih z (anti)androgenimi profili, zaradi česar je treba oceniti, ali kemikalija deluje z endokrinim načinom delovanja.

10. Priznava se, da morajo biti vsi postopki, pri katerih se uporabljajo živali, v skladu z lokalnimi standardi za varstvo živali; opisi oskrbe in ravnanja z živalmi v nadaljevanju so minimalni standardi, nadomestili pa jih bodo lokalni predpisi, kot je Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (26). Nadaljnje smernice o humanem ravnanju z živalmi je predložila OECD (17).

11. Kot pri vsakem biološkem preskusu, pri katerem se uporabljajo preskusne živali, je treba skrbno pretehtati nujnost izvedbe te študije. Razloga za takšno odločitev sta lahko dva:

— visok potencial za izpostavljenost (raven 1 temeljnega okvira) ali pokazatelji (anti)androgenosti v preskusih *in vitro* (raven 2), ki utemeljujejo preiskave glede tega, ali se lahko takšni učinki pojavijo *in vivo*,

— učinki, tipično povezani z (anti)androgenostjo v preskusih *in vivo* na ravni 4 ali 5, ki utemeljujejo preiskave določenega načina delovanja, npr. za ugotavljanje, ali so se učinki pojavili zaradi (anti)androgenega mehanizma.

▼M5

12. Opredelitve, uporabljene v tej preskusni metodi, so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

13. Hershbergerjev biološki preskus svojo občutljivost doseže z uporabo samcev z minimalno endogeno tvorbo androgenov. Uporabijo se kastrirani samci, če je po kastraciji dovoljenega dovolj časa, da se tarčna tkiva zmanjšajo na minimalno in enotno osnovno težo. Pri odkrivanju morebitne androgene dejavnosti so zato prisotne nizke endogene koncentracije cirkulirajočih androgenov, os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze tega učinka ne more izravnati prek povratnih mehanizmov, zmožnost odziva tkiva se poveča na največjo možno raven, začetna variabilnost teže tkiva pa se zmanjša na kar najnižjo raven. Pri odkrivanju morebitne antiandrogene dejavnosti je enakomernejše pridobivanje teže tkiva mogoče s stimulacijo tkiv z referenčnim androgenom. Zato je za izvajanje Hershbergerjevega biološkega preskusa potrebnih samo 6 živali na vsako skupino odmerka, pri drugih preskusih z nekastriranimi samci v puberteti ali odraslimi samci pa se priporoča uporaba 15 samcev na vsako skupino odmerka.

14. Kastracijo podgan moškega spola v obdobju okrog pubertete je treba opraviti na primeren način z uporabo odobrenih anestetikov in aseptično tehniko. Prvih nekaj dni po operaciji je treba dajati analgetike, da bi odpravili nelagodje po operaciji. Kastracija poveča natančnost preskusa pri odkrivanju šibkih androgenov in antiandrogenov, saj odstrani kompenzacijske endokrine povratne mehanizme, ki so prisotni pri nekastrirani živali in lahko oslabijo učinke danih androgenov in antiandrogenov, pa tudi veliko variabilnost koncentracij serumskega testosterona med osebki. Zato je zaradi kastracije potrebno manjše število živali za iskanje teh endokrinih dejavnosti.

15. Pri odkrivanju morebitne androgene dejavnosti se preskusna kemikalija 10 zaporednih dni dnevno daje oralno z gavažo ali s podkožno injekcijo. Preskusne kemikalije se dajejo vsaj dvema tretiranima skupinama preskusnih živali, pri čemer se za vsako skupino uporabi ena velikost odmerka. Približno 24 ur po prejetju zadnjega odmerka se na živalih opravi obdukcija. Če se je v primerjavi s kontrolno skupino z nosilcem teža dveh ali več tarčnih organov živali v skupinah, ki so prejele preskusno kemikalijo, statistično značilno povečala, to pomeni, da je preskusna kemikalija pozitivna na morebitno androgeno dejavnost (glej odstavek 60). Androgeni, kot je trenbolon, ki jih ni mogoče 5α-reducirati, imajo izrazitejše učinke na LABC in GP kot testosteron propionat, vendar bi se morala povečati teža vseh tkiv.

16. Pri odkrivanju morebitne antiandrogene dejavnosti se preskusna kemikalija 10 zaporednih dni dnevno daje oralno z gavažo ali s podkožno injekcijo skupaj z dnevnimi odmerki testosteron propionata (0,2 ali 0,4 mg/kg/d) s podkožno injekcijo. V programu validacije je bilo ugotovljeno, da se lahko uporabi 0,2 ali 0,4 mg/kg/d testosteron propionata, saj sta oba odmerka učinkovita pri zaznavanju antiandrogenov, zato je treba za uporabo v preskusu izbrati le enega od odmerkov. Stopnjevani odmerki preskusne kemikalije se dajejo vsaj trem tretiranim skupinam preskusnih živali, pri čemer se za vsako skupino uporabi ena velikost odmerka. Približno 24 ur po prejetju zadnjega odmerka se na živalih opravi obdukcija. Če se je v primerjavi s kontrolno skupino, ki je prejela samo testosteron propionat, teža dveh ali več tarčnih organov živali v skupinah, ki so prejele preskusno kemikalijo in testosteron propionat, statistično značilno zmanjšala, to pomeni, da je preskusna kemikalija pozitivna na morebitno antiandrogeno dejavnost (glej odstavek 61).

▼M5

OPIS METODE

Izbira vrste in seva

17. V Hershbergerjevem biološkem preskusu se od 30. let prejšnjega stoletja običajno uporabljajo podgane. Čeprav je biološko možno, da bi bil odziv pri podganah in miših podoben, so na podlagi 70-letnih izkušenj s podganami za Hershbergerjev biološki preskus primernejše podgane. Če bo po Hershbergerjevem biološkem preskusu morda izvedena dolgotrajna večgeneracijska študija, bo tako mogoče v obeh študijah uporabiti živali iste vrste, seva in izvora.

18. Ta protokol laboratorijem omogoča, da izberejo sev podgane za uporabo v preskusu; na splošno naj bi bil isti, kot ga je sodelujoči laboratorij že uporabljal. Lahko se uporabijo običajno uporabljeni laboratorijski sevi podgan; ne sme se uporabiti sevov, ki dozorijo precej pozneje kot pri starosti 42 dni, ker zaradi kastracije teh samcev pri starosti 42 dni morda ne bi bilo mogoče merjenje teže glavice penisa, kar se lahko opravi šele, ko se kožica loči od spolnega uda. Zato se sevi podgan Fisher 344 ne bi smeli uporabiti, razen izjemoma. Spolni razvoj seva podgan Fisher 344 poteka drugače kot pri drugih, običajno uporabljenih sevih, kot sta seva Sprague Dawley ali Wistar (16). Če bi bil uporabljen takšen sev, bi moral laboratorij podgane kastrirati, ko bi bile malo starejše, in dokazati občutljivost uporabljenega seva. Laboratorij mora jasno utemeljiti izbiro seva podgan. Če bo po presejalni študiji izvedena študija s ponavljajočim se odmerkom po oralni poti, študija razmnoževanja in razvoja ali dolgoročna študija, je najbolje, da se v vseh študijah uporabijo živali istega seva in istega izvora.

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

19. Vsi postopki morajo biti skladni z vsemi lokalnimi standardi za varstvo živali v laboratorijih. Ti opisi oskrbe in ravnanja z živalmi so minimalni standardi, ki jih bodo nadomestili strožji lokalni predpisi, kot je Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (26). Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi naj bo 22 °C (z odstopanjem približno ± 3 °C). Relativna vlažnost naj bo najmanj 30 % in po možnosti naj ne presega 70 %, razen med čiščenjem prostora. Cilj je 50–60-odstotna relativna vlažnost. Osvetlitev naj bo umetna. Dnevno zaporedje osvetlitve naj bo 12 ur svetlobe, 12 ur teme.

20. Ker so živali mlade in so podgane družabne živali, je zaželeno, da so nastanjene skupinsko in ne posamično. Z nastanitvijo dveh ali treh živali v vsako kletko živali ne bodo prenatrpane in pod s tem povezanim stresom, ki bi lahko vplival na hormonsko uravnavanje razvoja tkiv pomožnih spolnih organov. Kletke je treba temeljito očistiti, da se odstranijo morebitni kontaminanti, in jih razporediti tako, da so možni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Kletke primerne velikosti (~ 2 000 kvadratnih centimetrov) bodo preprečile prenatrpanost.

21. Živali je treba s humano metodo edinstveno označiti (npr. z ušesno znamko ali oznako). Metodo identifikacije je treba zabeležiti.

▼M5

22. Laboratorijsko prehrano in pitno vodo je treba priskrbeti *ad libitum*. Laboratoriji, ki izvajajo Hershbergerjev biološki preskus, bi morali uporabljati laboratorijsko prehrano, ki jo običajno uporabljajo pri preskušanju kemikalij. V validacijski študiji biološkega preskusa niso bili opaženi nobeni učinki ali variabilnost, ki bi jih lahko pripisali prehrani. Prehrano, ki se uporablja, je treba zabeležiti, vzorec laboratorijske prehrane pa shraniti za morebitno prihodnjo analizo.

Merila uspešnosti za težo od androgenov odvisnih organov

23. Med validacijsko študijo ni bilo nobenih dokazov, da zmanjšanje telesne teže vpliva na povečanje ali zmanjšanje teže tkiva pri tarčnih tkivih (tj. tistih, ki jih je treba v tej študiji stehtati).

24. Med različnimi sevi podgan, uspešno uporabljenimi v programu validacije, je teža od androgenov odvisnih organov večja pri težjih sevih podgan kot pri lažjih sevih. Zato merila uspešnosti Hershbergerjevega biološkega preskusa ne vključujejo absolutne pričakovane teže organov za pozitivne in negativne kontrolne vzorce.

25. Ker je koeficient variacije za tkivo obratno sorazmeren s statistično značilnostjo, merila uspešnosti za Hershbergerjev biološki preskus temeljijo na najvišjih vrednostih koeficienta variacije za vsako tkivo (tabela 1). Koeficienti variacije se izpeljejo iz validacijskih študij OECD. Če so rezultati negativni, morajo laboratoriji preveriti koeficiente variacije iz kontrolne skupine in skupine, tretirane z velikim odmerkom, da bi ugotovili, ali so bila presežena merila uspešnosti za največji koeficient variacije.

26. Študijo je treba ponoviti, ko: 1) trije ali več od desetih možnih posameznih koeficientov variacije v kontrolni skupini in skupini, tretirani z velikim odmerkom, presežejo najvišje vrednosti, ki so za študije agonistov in antagonistov določene v tabeli 1, in 2) sta bili vsaj dve tarčni tkivi mejno zanemarljivi, tj. so bile vrednosti ρ med 0,05 in 0,10.

Tabela 1

Najvišji dovoljeni koeficienti variacij, določeni za tarčna tkiva pomožnih spolnih organov za kastriran model v validacijski študiji OECD ([1])

Tkivo	Antiandrogeni učinki	Androgeni učinki
Semenska mešička	40 %	40 %
Ventralna prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperjevi žlezi	35 %	55 %
Glavica penisa	17 %	22 %

([1]) Mejni koeficient variacij za zadevno tkivo je bil določen s pomočjo grafa vrednosti koeficienta variacij – zaporedno podanih od najnižje do najvišje – za vse srednje vrednosti iz vseh preskusov v validaciji z določenim modelom (z agonistom ali antagonistom). Mejna vrednost koeficienta variacij je bila odčitana s točke, pri kateri so vmesna povečanja do naslednjega najvišjega koeficienta variacij v seriji precej večja kot prejšnjih nekaj koeficientov variacij – 'točka preloma'. Opozoriti je treba, da so bile s to analizo sicer opredeljene relativno zanesljive 'točke preloma' za preskus z antagonistom, vendar so krivulje koeficienta variacij za preskus z agonistom pokazale bolj enakomerno povečanje, zaradi česar je opredelitev mejne vrednosti koeficienta variacij s to metodo do neke mere arbitrarna.

▼M5

POSTOPEK

Skladnost z zakonodajo in verifikacija laboratorija

27. V nasprotju z uterotropnim preskusom (poglavje B.54 te priloge) dokazovanje usposobljenosti laboratorija pred začetkom študije pri Hershbergerjevem biološkem preskusu ni potrebno, ker so pri tem preskusu hkratni pozitivni (testosteron propionat in flutamid) in negativni kontrolni vzorci sestavni del preskusa.

Število in stanje živali

28. Vsaka tretirana in kontrolna skupina mora vključevati vsaj 6 živali. To velja tako za androgeni kot tudi za antiandrogeni protokol.

Kastracija

29. Več dni po prejemu živali naj bi potekalo začetno obdobje prilagajanja, s čemer se zagotovi, da so živali zdrave in se razvijajo. Ker pri živalih, ki so bile kastrirane pred 42. dnem starosti ali 42. poporodnim dnem, morda ne bo prišlo do ločevanja prepucija, bi morale biti živali kastrirane na 42. poporodni dan ali pozneje, ne pa prej. Živali se kastrirajo pod anestezijo tako, da se zareže v modnik in odstranijo obe modi ter obmodki z ligacijo žil in semenovoda. Po potrditvi, da ni nobene krvavitve, je treba modnik zapreti s šivom ali sponkami. V prvih nekaj dneh po operaciji naj bi živali prejemale analgetike, da bi ublažili nelagodje po operaciji. Če se pri dobavitelju nabavijo kastrirane živali, mora dobavitelj zagotoviti starost živali in stopnjo spolne zrelosti.

Prilagajanje po kastraciji

30. Prilagajanje živali na laboratorijske pogoje mora potekati še vsaj 7 dni po kastraciji, da se zmanjša teža tarčnih tkiv. Živali je treba opazovati dnevno, vsako žival, ki kaže znake bolezni ali telesne anomalije, pa je treba odstraniti. Tretiranje z začetkom dajanja odmerkov (v študiji) se lahko prične že 49. poporodni dan, vendar ne pozneje kot 60. poporodni dan. Starost ob obdukciji ne bi smela preseči 70. poporodnega dneva. Ta prožnost laboratoriju omogoča, da učinkovito sestavi razpored preskusov.

Telesna teža in randomizacija skupine

31. Zaradi različne telesne teže posameznih živali se znotraj skupine in med skupinami živali teža organov razlikuje. S povečanjem variabilnosti teže tkiv se poveča koeficient variacij in zmanjša statistična vrednost preskusa (včasih imenovana tudi občutljivost preskusa). Zato je treba nihanja telesne teže eksperimentalno in statistično uravnavati.

32. V eksperimentalno uravnavanje sodi zagotavljanje majhnih nihanj v telesni teži znotraj skupin študije in med njimi. Treba se je izogniti uporabi nenavadno majhnih ali velikih živali ter se jih ne sme uvrstiti v kohorto študije. Na začetku študije naj nihanje teže uporabljenih živali ne preseže ± 20 % srednje teže (npr. 175 g ± 35 g za kastrirane podgane v obdobju okrog pubertete). Živali je treba dodeliti v skupine (kontrolne in tretirane) v naključnem razponu teže, tako da se povprečna telesna teža vsake skupine statistično ne razlikuje od drugih skupin. Uporabljeni postopek randomizacije sklopov je treba zabeležiti.

▼M5

33. Ker lahko strupenost zmanjša telesno težo tretiranih skupin v primerjavi s telesno težo kontrolne skupine, se lahko kot sočasna spremenljivka uporabi telesna teža na prvi dan prejemanja kemikalije in ne telesna teža ob obdukciji.

Odmerjanje

34. Da bi ugotovili, ali lahko preskusna kemikalija *in vivo* deluje androgeno, običajno zadoščajo dve skupini odmerkov preskusne kemikalije ter pozitivna kontrolna skupina in skupina z nosilcem (negativna kontrolna skupina) (glej odstavek 43), zato je takšen način preskušanja zaželen zaradi dobrobiti živali. Če je cilj pridobiti krivuljo odziva na odmerek ali ekstrapolacija na manjše odmerke, so potrebne vsaj 3 skupine odmerkov. Če ni potrebna samo opredelitev androgenega delovanja, ampak so potrebne tudi druge informacije (na primer ocena moči delovanja), je treba razmisliti o drugačnem režimu odmerjanja. Za preskušanje za antiandrogene se preskusna kemikalija daje skupaj z referenčnim agonistom androgenov. Uporabijo se vsaj 3 preskusne skupine z različnimi odmerki preskusne kemikalije ter pozitivna in negativna kontrolna skupina (glej odstavek 44). Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če je pri dajanju preskusne kemikalije uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti količino nosilca, enako največji uporabljeni količini pri preskusnih skupinah.

35. Pri predlaganju in izbiri velikosti vseh odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o strupenosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na razpolago za preskusno kemikalijo ali sorodne snovi. Pri največjem odmerku je treba najprej upoštevati informacije o LD_{50} in/ali akutni strupenosti, da bi se izognili smrti, hudemu trpljenju ali stiski živali (17) (18) (19) (20), pa tudi informacije, ki so na voljo o odmerkih, uporabljenih v študijah kroničnosti in subkroničnosti. Na splošno se zaradi največjega odmerka končna telesna teža živali ne sme zmanjšati za več kot 10 % kontrolne teže. Največji odmerek je lahko 1) največji odmerek, ki zagotavlja preživetje živali in za živali ni preveč strupen oziroma jim ne povzroča velike stiske po 10 zaporednih dneh dajanja odmerka do največjega odmerka 1 000 mg/kg/dan (glej odstavek 36), ali 2) odmerek, ki povzroči (anti)androgene učinke, pri čemer se izbere manjši izmed njiju. Kot sito so sprejemljivi veliki intervali med odmerki, npr. polovica logaritemske enote (kar ustreza večanju odmerka za faktor 3,2) ali celo ena logaritemska enota. Če ustrezni podatki niso na voljo, se lahko opravi študija ugotavljanja območja (glej odstavek 37), s pomočjo katere se določijo odmerki za uporabo.

Mejna velikost odmerka

36. Če preskus, izveden v skladu z opisanimi postopki za to študijo in pri mejnem odmerku 1 000 mg/kg telesne teže/dan in manjšim odmerkom, ne doseže statistično značilne spremembe v teži razmnoževalnih organov, se dodatne velikosti odmerkov morda ne štejejo za potrebne. Mejni odmerek se ne uporabi samo, če podatki o izpostavljenosti pri ljudeh kažejo na potrebo po uporabi večjega odmerka.

Preudarki glede ugotavljanja območja

37. Po potrebi se lahko z nekaj živalmi izvede predhodna študija za ugotavljanje območja za izbiro primernih skupin odmerkov (z uporabo metod za preskušanje akutne strupenosti (poglavji B.1 bis in B.1 tris te priloge (27), Smernica za preskušanje OECD št. 425 (19))). Cilj pri Hershbergerjevem biološkem preskusu je izbrati odmerke, ki zagotavljajo preživetje živali in zanje niso preveč strupeni oziroma jim ne povzročajo prevelike stiske po desetih zaporednih dneh dajanja kemikalije do mejnega odmerka

▼M5

1 000 mg/kg/dan, kot je navedeno v odstavkih 35 in 36. S tem v zvezi se lahko uporabijo smernice OECD (17), v katerih so opredeljeni klinični znaki, ki kažejo na strupenost za živali ali njihovo stisko. Če je to v okviru te študije za ugotavljanje območja po desetih dneh dajanja odmerkov izvedljivo, se lahko tarčna tkiva izreže in stehta približno 24 ur po zadnjem danem odmerku. Ti podatki se nato lahko uporabijo kot pomoč pri izbiri odmerkov v glavni študiji.

Referenčne kemikalije in nosilec

38. Referenčni agonist androgenov naj bi bil testosteron propionat (TP), št. CAS 57-82-5. Referenčni odmerek TP je lahko 0,2 mg/kg telesne teže/dan ali 0,4 mg/kg telesne teže/dan. Referenčni antagonist androgenov naj bi bil flutamid (FT), št. CAS 1311-84-7. Referenčni odmerek FT naj bi bil 3 mg/kg telesne teže/dan, FT pa je treba dati skupaj z referenčnim odmerkom TP.

39. Priporoča se, da se, kadar koli je to mogoče, najprej prouči uporaba vodne raztopine/suspenzije. Ker so številni ligandi androgenov ali njihovi metabolični prekurzorji hidrofobni, se običajno uporablja raztopina/suspenzija v olju (npr. koruznem, arašidovem, sezamovem ali oljčnem olju). Preskusne kemikalije se lahko raztopijo v najmanjši količini 95-odstotnega etanola ali drugega primernega topila, na končno delovno koncentracijo pa razredčijo v preskusnem nosilcu. Strupene lastnosti topila bi morale biti znane in preskušene v ločeni kontrolni skupini, pri kateri je uporabljeno samo topilo. Če je preskusna kemikalija stabilna, se lahko raztapljanje preskusne kemikalije pospeši s previdnim segrevanjem in močnim mehanskim delovanjem. Določiti je treba stabilnost preskusne kemikalije v nosilcu. Če je preskusna kemikalija ves čas trajanja študije stabilna, se lahko pripravi samo začetni alikvot preskusne kemikalije, nato pa se dnevno pripravljajo določene razredčine odmerkov, pri čemer je treba paziti, da ne pride do kontaminacije in kvarjenja vzorcev.

Dajanje odmerkov

40. TP je treba dati s podkožnim injiciranjem, FT pa oralno z gavažo.

41. Preskusno kemikalijo se daje oralno z gavažo ali s podkožnim injiciranjem. Pri izbiri načina dajanja je treba upoštevati vprašanja, povezana z dobrobitjo živali in fizikalne/kemijske lastnosti preskusne kemikalije. Poleg tega je treba upoštevati toksikološke vidike, kot je način izpostavljenosti kemikaliji pri ljudeh (npr. na podlagi dajanja oralno z gavažo se modelira izpostavljenost prek zaužitja, na podlagi podkožnega injiciranja se modelira izpostavljenost prek vdihavanja ali adsorpcije skozi kožo) in obstoječe toksikološke podatke ter o presnovi in kinetiki (npr. potreba po izogibanju presnovi prvega prehoda, boljša učinkovitost določenega načina izpostavljenosti) pred začetkom obsežnega, dolgotrajnega preskušanja, če se pozitivni rezultati dobijo z injiciranjem.

42. Živali naj bi odmerek prejemale na enak način in v enakem časovnem zaporedju deset zaporednih dni v približno 24-urnih intervalih. Velikost odmerka je treba dnevno prilagajati glede na hkratno dnevno merjenje telesne teže. Količina odmerka in čas vnosa naj se zabeležita vsak dan izpostavljenosti. Da bi bila mogoča smiselna razlaga podatkov, je treba paziti, da se ne preseže največji odmerek iz odstavka 35. Zmanjšanje telesne teže, klinične znake in druge ugotovitve je treba temeljito ovrednotiti. Pri dajanju oralno z gavažo se uporabi želodčna sonda ali primerna intubacijska

▼M5

kanila. Največja količina tekočine, ki se jo lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Upoštevati je treba lokalne standarde za varstvo živali, količina pa ne sme preseči 5 ml/kg telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi 10 ml/kg telesne teže. Pri podkožnem injiciranju se odmerki dajejo na dorzoskapularnem in/ali ledvenem delu s sterilno iglo (npr. velikosti 23 ali 25) in brizgo tuberkulinko. Mesto injiciranja se lahko obrije. Morebitne izgube, uhajanje snovi na mestu injiciranja ali nepopoln vnos odmerka je treba zabeležiti. Skupna količina odmerka na podgano na dan ne sme preseči 0,5 ml/kg telesne teže.

Posebni postopki za agoniste androgenov

43. Za preskus za agoniste androgenov je nosilec negativna kontrola, skupina, ki prejema TP, pa pozitivna kontrola. Biološka dejavnost, ki je skladna z agonisti androgenov, se preskuša z dajanjem izbranih odmerkov preskusne kemikalije tretiranim skupinam 10 dni zapored. Teža tkiv petih pomožnih spolnih organov živali v skupinah, ki so prejele preskusno kemikalijo, se primerja s skupino za nosilec, da bi se ugotovila statistično značilna povečanja teže.

Posebni postopki za antagoniste androgenov in zaviralce 5α-reduktaze

44. Za preskus za antagoniste androgenov in zaviralce 5α-reduktaze je skupina, ki prejema TP, negativna kontrola, skupina, ki hkrati prejema referenčna odmerka TP in FT, pa pozitivna kontrola. Biološka dejavnost, ki je skladna z antagonisti androgenov in zaviralci 5α-reduktaze, se preskuša z dajanjem referenčnega odmerka TP in dajanjem preskusne kemikalije 10 dni zapored. Teža tkiv petih pomožnih spolnih organov živali v skupinah, ki so prejele preskusno kemikalijo in TP, se primerja z referenčno skupino, ki je prejela samo TP, da bi se ugotovila statistično značilna zmanjšanja teže.

OPAZOVANJA

Klinična opazovanja

45. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat dnevno in pogosteje, če se kažejo znaki strupenosti. Opazovanja je najbolje opraviti vsak dan ob istih časih ob upoštevanju vrhunca pričakovanih učinkov po odmerjanju. Vse živali je treba opazovati za določitev smrtnosti, obolevnosti in splošnih kliničnih znakov, kot so spremembe vedenja, spremembe na koži, dlaki, očeh in sluznicah, pojav sekrecije in ekskrecije ter delovanje avtonomnega živčevja (npr. solzenje, piloerekcija, velikost zenic, nenavaden vzorec dihanja).

46. Živali, ki so najdene poginule, je treba odstraniti in uničiti brez nadaljnje analize podatkov. Smrtnost živali pred obdukcijo in morebitne očitne razloge za smrtnost je treba vključiti v evidenco študije. Umirajoče živali je treba humano usmrtiti. Umirajoče in posledično usmrčene živali ter očitne razloge za obolevnost je treba vključiti v evidenco študije.

▼M5

Telesna teža in poraba hrane

47. Vse živali je treba stehtati dnevno na 0,1 g natančno, in sicer tik pred začetkom tretiranja, tj. ko so živali razdeljene v skupine. Izmeri se lahko tudi količina hrane, ki jo živali porabijo med obdobjem tretiranja, in sicer za vsako posamezno kletko s tehtanjem hranilnic. Rezultati glede porabe hrane se izrazijo v gramih na podgano na dan.

Seciranje in merjenje teže tkiv in organov

48. Približno 24 ur po zadnjem odmerku preskusne kemikalije je treba podgane usmrtiti in opraviti izkrvavitev v skladu z običajnimi postopki zadevnega laboratorija ter opraviti obdukcijo. Metodo humane usmrtitve je treba zabeležiti v laboratorijskem poročilu.

49. Zaželen je naključni vrstni red obdukcije po skupinah, da ne bi prišlo do napredovanja neposredno po skupinah odmerkov, kar bi lahko vplivalo na podatke. Vse ugotovitve pri obdukciji, tj. patološke spremembe/vidne poškodbe, je treba zabeležiti in o njih poročati.

50. Pet od androgenov odvisnih tkiv (VP, SV, LABC, COW, GP) je treba stehtati. Ta tkiva je treba izrezati, previdno odstraniti priraščena tkiva in maščobo ter določiti njihovo svežo (nefiksirano) težo. Z vsakim tkivom je treba ravnati zelo skrbno, da ne bi prišlo do izgube tekočin in izsušitve, zaradi česar bi lahko prišlo do precejšnjih napak in variabilnosti, saj bi se zabeležene teže zmanjšale. Več tkiv je lahko zelo majhnih ali jih je težko secirati, zaradi česar bo prišlo do variabilnosti. Zato je pomembno, da osebe, ki secirajo tkiva pomožnih spolnih organov, poznajo standardne postopke seciranja za ta tkiva. Priročnik s standardnim operativnim postopkom za seciranje je na voljo na spletni strani OECD (21). S skrbnim usposabljanjem v skladu s priročnikom s standardnim operativnim postopkom se bo zmanjšal morebitni vir variacij v študiji. Zaželeno je, da je za seciranje zadevnega tkiva zadolžen isti obducent, saj tako ne pride do razlik med posamezniki pri obdelavi tkiva. Če to ni mogoče, bi morala biti obdukcija zasnovana tako, da vsak obducent secira zadevno tkivo iz vseh tretiranih skupin, namesto da en posameznik secira vsa tkiva kontrolne skupine, nekdo drug pa je zadolžen za tretirane skupine. Vsako tkivo pomožnega spolnega organa je treba stehtati brez pivnanja na 0,1 mg natančno in zabeležiti težo za vsako žival.

51. Več tkiv je lahko zelo majhnih ali pa jih je težko secirati, zaradi česar bo prišlo do variabilnosti. Iz preteklega dela je razvidna vrsta koeficientov variacij, za katere se zdi, da se razlikujejo glede na strokovnost laboratorija. V nekaj primerih so bile v določenem laboratoriju ugotovljene velike razlike v absolutni teži tkiv, kot sta ventralna prostata in Cowperjevi žlezi.

52. Lahko se opravijo tudi meritve jeter, obeh ledvic in obeh nadledvičnih žlez. S teh tkiv je prav tako treba odstraniti odvečno priraščeno vezivno tkivo in maščobo. Jetra je treba stehtati in težo zabeležiti na 0,1 g natančno, prav tako je treba stehtati obe ledvici in nadledvični žlezi ter težo zabeležiti na 0,1 mg natančno. Jetra, ledvici in nadledvični žlezi so organi, na katere vplivajo androgeni, in dobri pokazatelji sistemske strupenosti.

▼**M5**

53. Lahko se opravijo tudi meritve serumskega luteinizirajočega hormona (LH), hormona, ki spodbuja rast foliklov (FSH), in testosterona (T). Koncentracije serumskega testosterona so koristne pri ugotavljanju, ali preskusna kemikalija povzroča presnovo testosterona v jetrih in tako znižuje koncentracije v serumu. Brez podatkov o testosteronu bi se lahko zdelo, da je do tega učinka prišlo zaradi antiandrogenega mehanizma. Koncentracije LH zagotavljajo informacije glede zmožnosti antiandrogena, da zmanjša težo organov in vpliva na funkcijo hipotalamusa in hipofize, ki lahko v dolgotrajnih študijah povzroči tumorje na modih. Hormon FSH je pomemben hormon za spermatogenezo. Lahko se opravijo tudi meritve T4 in T3 v serumu, ki bi zagotovile koristne dodatne informacije o zmožnosti za porušenje hormonskega ravnovesja ščitnice. Če se bodo opravile meritve hormonov, je treba pred obdukcijo podgane omamiti in vzeti kri s punkcijo srca, metodo anestezije pa je treba skrbno izbrati, da ne bi vplivala na meritve hormonov. Metodo priprave seruma, vir radioimunskega preskusa ali druge komplete za merjenje, analitične postopke in rezultate je treba zabeležiti. Koncentracije LH je treba zabeležiti kot ng na ml seruma in testosteron je treba prav tako zabeležiti kot ng na ml seruma.

54. Seciranje tkiv je opisano v nadaljevanju s podrobnim priročnikom za seciranje s fotografijami, ki so bile kot dodatno gradivo objavljene v okviru programa validacije (21). Na spletni strani korejske uprave za hrano in zdravila je na voljo tudi posnetek seciranja (22).

— Žival je obrnjena z ventralno površino navzgor; preveriti je treba, ali se je kožica penisa ločila od glavice. Če sta ločeni, je treba umakniti kožico in odstraniti glavico penisa, jo stehtati (na 0,1 mg natančno) in težo zabeležiti.

— Kožo na trebuhu in trebušno steno je treba prerezati, s čemer se razkrijejo notranji organi. Če se bodo opravile meritve neobveznih organov, je treba odstraniti jetra in jih stehtati na 0,1 g natančno, odstraniti želodec in črevesje, odstraniti obe ledvici in nadledvični žlezi ter jih stehtati na 0,1 mg natančno. S tem postopkom se razkrije mehur in začne seciranje tarčnih moških pomožnih organov.

— Za seciranje ventralne prostate (VP) je treba mehur s prerezom veznega tkiva po sredini ločiti od plasti ventralnih mišic. Mehur je treba premakniti anteriorno proti semenskim mešičkom, da se razkrijeta levi in desni reženj ventralne prostate (prekrita s plastjo maščobe). Z desnega in levega režnja VP je treba previdno odstraniti maščobo. Desni reženj VP je treba previdno odmakniti od sečnice ter ločiti reženj in sečnico. Med držanjem desnega režnja VP je treba nežno odmakniti levi reženj VP in ga izrezati; režnja je treba stehtati na 0,1 mg natančno in težo zabeležiti.

— Za seciranje semenskih mešičkov in koagulacijskih žlez je treba kavdalno premakniti mehur, s čemer se razkrijejo semenovod, desni in levi reženj semenskih mešičkov in koagulacijske žleze (SVCG). Treba je preprečiti uhajanje tekočine, in sicer tako, da se s sponko spne spodnji del SVCG, kjer se stikata semenovod in sečnica. SVCG je treba previdno izrezati, s sponko še vedno na mestu odstraniti maščobo in priraščena tkiva, nato pa ju položiti v tarirano posodo za tehtanje, odstraniti sponko, stehtati organe na 0,1 mg natančno in težo zabeležiti.

▼M5

— Za seciranje mišice levator ani z bulbokavernozno mišico (LABC) je treba razkriti mišice in koren penisa. Mišice LA so ovite okrog debelega črevesa, sprednje mišice LA in BC pa so pritrjene na čebulček penisa. Odstraniti je treba kožo in adneks s perianalnega območja, ki potekata od korena penisa do sprednjega dela anusa. Postopoma je treba odstraniti mišice BC od čebulčka in tkiv. Debelo črevo je treba prerezati na pol, nato pa se lahko v celoti izrežejo mišice LABC in odstranijo. Z mišic LABC je treba odstraniti maščobo in priraščena tkiva, nato pa mišice stehtati na 0,1 mg natančno in težo zabeležiti.

— Ko so mišice LABC odstranjene, sta vidni okrogli Cowperjevi ali bulbouretralni žlezi (COW) pri spodnjem delu in nekoliko dorzalno od čebulčka. Pri izrezu je potrebna previdnost, da se ne poškoduje tanka kapsula, zaradi česar bi iztekala tekočina. Cowperjevi žlezi je treba stehtati na 0,1 mg natančno in težo zabeležiti.

— Zabeležiti je treba tudi izgubo tekočine iz katere koli žleze med obdukcijo in seciranjem.

55. Če je za oceno vsake kemikalije potrebna obdukcija večjega števila živali, kot je smiselno za en dan, se lahko začetek študije razporedi na dva zaporedna dneva, kar pomeni, da bo obdukcija in s tem povezano delo razporejeno na dva dneva. V tem primeru je treba uporabiti polovico živali vsake od tretiranih skupin na dan.

56. Po obdukciji je treba trupla uničiti na primeren način.

POROČANJE

Podatki

57. Podatki se sporočajo posamično (tj. telesna teža, teža tkiva pomožnih spolnih organov, neobvezne meritve ter drugi odzivi in opažanja) in za vsako skupino živali (srednji in standardni odkloni vseh meritev). Podatki se povzamejo v obliki tabele. Podatki prikazujejo število živali na začetku preskusa, število živali, najdenih poginulih ali najdenih, ko kažejo znake strupenosti med preskusom, opis znakov zaznane strupenosti, vključno s časom njenega začetka, trajanja in resnosti.

58. Končno poročilo mora vključevati naslednje podatke:

Preskuševalni laboratorij:

— naziv laboratorija, kraj,

— vodjo študije in drugo osebje ter njegove pristojnosti v zvezi s študijo,

— datume začetka in konca študije, tj. prvi dan dajanja preskusne kemikalije oziroma zadnji dan obdukcije.

Preskusna kemikalija:

— izvor, številko serije, vrsto, čistoto, polni naslov dobavitelja in opredelitev preskusnih kemikalij,

— agregatno stanje in, če je to ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti,

— pogoje shranjevanja, metodo in pogostost priprave razredčin,

— morebitne podatke o stabilnosti,

— morebitne analize raztopin/suspenzij za odmerjanje.

▼**M5**

Nosilec:

— opredelitev nosilca (vrsta, dobavitelj in št. serije),

— utemeljitev izbire nosilca (če ta ni voda).

Preskusne živali in postopki reje živali:

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev izbire,

— izvor ali dobavitelja živali, vključno s polnim naslovom,

— število in starost dobavljenih živali,

— pogoje nastanitve (temperaturo, osvetlitev itd.),

— prehrano (ime, vrsto, dobavitelja, št. serije, vsebino in, če so znane, ravni fitoestrogenov),

— steljo (ime, vrsto, dobavitelja, vsebino),

— pogoje v kletkah in število živali na posamezno kletko.

Preskusni pogoji:

— starost ob kastraciji in trajanje prilagajanja po kastraciji,

— teže posameznih živali ob začetku študije (na 0,1 g natančno),

— postopek randomizacije in evidenco dodelitve v skupine z nosilcem, referenčne skupine, skupine, ki so prejele preskusno kemikalijo, in kletke,

— srednji in standardni odklon telesne teže za vsako skupino za vsak dan tehtanja v času trajanja študije,

— utemeljitev izbire odmerka,

— način dajanja preskusne kemikalije in utemeljitev izbire načina izpostavljenosti,

— če je bil opravljen preskus za antiandrogenost, tretiranje s TP (odmerek in količino),

— tretiranje s preskusno kemikalijo (odmerek in količina),

— čas odmerjanja,

— postopke obdukcije, vključno z načini izkrvavitve in morebitne anestezije,

— če so bile opravljene analize seruma, podrobnosti metode. Če je bil na primer uporabljen radioimunski preskus (RIA), je treba sporočiti izvor kompletov za izvedbo preskusa, datum poteka kompleta, postopek scintilacijskega štetja in standardiziranje.

Rezultati:

— dnevna opazovanja za vsako žival med dajanjem odmerkov, vključno s:

— telesno težo (na 0,1 g natančno),

— kliničnimi znaki (če se pojavijo),

— morebitnimi meritvami ali opombami o porabi hrane,

— opazovanja pri obdukciji za vsako žival, vključno z:

▼M5

— datumom obdukcije,

— skupino tretiranja živali,

— identifikacijsko oznako živali,

— obducentom,

— časom dneva, ko sta bili opravljeni obdukcija in seciranje,

— starostjo živali,

— končno telesno težo pri obdukciji in zabeleženo morebitno statistično značilno povečanje ali zmanjšanje,

— vrstnim redom izkrvavitve živali in seciranja pri obdukciji,

— težo petih tarčnih od androgenov odvisnih tkiv:

— ventralne prostate (na 0,1 mg natančno),

— semenskih mešičkov in koagulacijskih žlez, skupaj s tekočino (obeh, na 0,1 mg natančno),

— sistema mišice levator ani z bulbokavernozno mišico (na 0,1 mg natančno),

— Cowperjevih žlez (sveža teža – obeh, na 0,1 mg natančno),

— glavice penisa (sveža teža, na 0,1 mg natančno),

— morebitno težo neobveznih tkiv:

— jeter (na 0,1 g natančno),

— ledvic (obeh, na 0,1 mg natančno),

— nadledvičnih žlez (obeh, na 0,1 mg natančno),

— splošne pripombe in komentarje,

— morebitne analize serumskih hormonov:

  — serum LH (ni obvezno – ng na ml seruma) in

  — serum T (ni obvezno – ng na ml seruma)

— splošne pripombe in komentarje.

Povzetek podatkov

Podatke je treba prikazati v obliki tabele, v kateri so navedeni podatki o velikosti vzorca za vsako skupino, srednje vrednosti in standardna napaka povprečnega ali standardnega odklona. Tabele bi morale vsebovati telesno težo živali pri obdukciji, spremembe telesne teže od začetka odmerjanja do obdukcije, težo tkiv tarčnih pomožnih spolnih organov in težo neobveznih tkiv.

Razprava o rezultatih

Analiza rezultatov

59. Telesno težo in težo organov ob obdukciji je treba statistično analizirati za lastnosti, kot je homogenost varianc, za analizo pa po potrebi ustrezno pretvoriti podatke. Tretirane skupine je treba primerjati s kontrolno skupino s tehnikami, kot je ANOVA, ki ji sledi primerjava po parih (npr. Dunnettov enostranski preskus) in merilo za statistično razliko, npr. $p \leq 0,05$. Skupine s statistično značilnostjo je treba identificirati. Vendar se je treba 'relativni teži' organov izogibati zaradi neveljavnih statističnih predpostavk, na katerih temelji ta obdelava podatkov.

▼**M5**

60. Za agonizem androgenov mora biti kontrola preskusna skupina, tretirana samo z nosilcem. Zaradi značilnosti delovanja preskusne kemikalije se lahko tkiva različno relativno odzivajo; na primer trenbolon, ki ga ni mogoče 5 alfa-reducirati, ima izrazitejše učinke na LABC in GP kot testosteron propionat. Statistično značilno povečanje ($p \leq 0,05$) teže dveh ali več tarčnih od androgenov odvisnih tkiv (VP, LABC, GP, CG in SVCG) se šteje za pozitiven rezultat na agoniste androgenov, določena stopnja povečane rasti pa bi se morala pojaviti pri vseh tarčnih tkivih. Skupna ocena odzivov vseh tkiv pomožnih spolnih organov je mogoča z uporabo ustrezne multivariantne analize podatkov. Tako bi se lahko analiza izboljšala, zlasti v primerih, ko se statistično značilen odziv pojavi samo pri enem tkivu.

61. Za agonizem androgenov mora biti kontrola preskusna skupina, tretirana z referenčnim androgenom (samo s testosteron propionatom). Zaradi značilnosti delovanja preskusne kemikalije se lahko tkiva različno relativno odzivajo; na primer zaviralci 5α-reduktaze imajo v primerjavi z močnimi antagonisti AR, kot je flutamid, izrazitejše učinke na ventralno prostato kot na druga tkiva. Statistično značilno zmanjšanje ($p \leq 0,05$) teže dveh ali več tarčnih od androgenov odvisnih tkiv (VP, LABC, GP, CG in SVCG) v primerjavi s tretiranjem samo s testosteron propionatom se šteje za pozitiven rezultat na antagoniste androgenov, določena stopnja zmanjšanja rasti pa bi se morala pojaviti pri vseh tarčnih tkivih. Skupna ocena odzivov vseh tkiv pomožnih spolnih organov je mogoča z uporabo ustrezne multivariantne analize podatkov. Tako bi se lahko analiza izboljšala, zlasti v primerih, ko se statistično značilen odziv pojavi samo pri enem tkivu.

62. Podatke je treba prikazati v obliki tabele, v kateri so navedeni srednja vrednost, standardna napaka srednje vrednosti (sprejemljiv bi bil tudi standardni odklon) in podatki o velikosti vzorca za vsako skupino. Vključene bi morale biti tudi tabele s podatki za posamezne živali. Preveriti je treba posamične vrednosti, srednjo vrednost, standardno napako (standardni odklon) in vrednosti koeficienta variacij za kontrolne podatke, da bi ugotovili, ali izpolnjujejo sprejemljiva merila za skladnost s pričakovanimi preteklimi vrednostmi. S pomočjo koeficientov variacij, ki presegajo vrednosti koeficientov variacij iz tabele 1 (glej odstavka 25 in 26) za težo vsakega organa, je treba ugotoviti, ali je prišlo do napake pri beleženju ali vnašanju podatkov oziroma ali laboratorij še ne obvlada popolnoma natančnega seciranja od androgenov odvisnih tkiv in je potrebno nadaljnje usposabljanje/praksa. Na splošno so koeficienti variacij (standardni odklon deljen s povprečno težo organa) ponovljivi med laboratoriji in študijami. Predstavljeni morajo biti vsaj podatki za ventralno prostato, semenski mešiček, mišico levator ani z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi, glavico penisa in jetra ter podatki o teži organov in spremembi telesne teže od začetka odmerjanja do obdukcije. Podatki so lahko predstavljeni tudi po prilagoditvi kovariance za telesno težo, vendar ne namesto predstavitve neprilagojenih podatkov. Poleg tega je treba v primeru, da do ločitve prepucija ne pride v nobeni od skupin, pojavnost ločitve prepucija zabeležiti in s Fisherjevim natančnim preskusom statistično primerjati s kontrolno skupino.

▼**M5**

63. Ko se s pomočjo originalnih obrazcev preverja točnost podatkov, vnesenih v računalnik, je treba vrednosti teže organov, ki niso biološko verjetne ali pa se od povprečij te tretirane skupine razlikujejo za več kot tri standardne odklone, natančno preveriti in po potrebi zavreči kot napake pri beleženju.

64. Primerjava rezultatov študije z vrednostmi koeficientov variacije OECD (v tabeli 1) je pogosto pomemben korak pri razlagi glede veljavnosti rezultatov študije. Pretekli podatki kontrolnih skupin z nosilcem naj bodo shranjeni v laboratoriju. Pretekli podatki o odzivih na pozitivne referenčne kemikalije, kot sta testosteron propionat in flutamid, naj bodo prav tako shranjeni v laboratoriju. Laboratoriji lahko tudi redno preskušajo odziv na znane šibke agoniste in antagoniste androgenov ter te podatke hranijo. Zaradi zagotavljanja, da se z metodami laboratorija dobi ustrezno statistično natančnost in moč, se lahko ti podatki primerjajo z razpoložljivimi podatki OECD.

▼**M5**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV:

Androgen je izraz, ki se uporablja za opis pozitivnega vpliva na rast od androgenov odvisnih tkiv.

Antiandrogen je zmožnost kemikalije, da v organizmu sesalca zavre delovanje testosteron propionata.

Kemikalija je snov ali zmes.

Datum skotitve je poporodni dan 0.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Pri Hershbergerjevem biološkem preskusu je odmerek izražen kot teža preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan).

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostost in trajanje dajanja odmerka.

Umirajoč je izraz, ki se uporablja za opis umirajoče živali, tj. živali, ki je blizu smrti.

Poporodni dan N je N-ti dan življenja po dnevu skotitve.

Občutljivost je zmožnost preskusne metode, da pravilno identificira kemikalije, ki imajo lastnost, zaradi katere so preskušane.

Specifičnost je zmožnost preskusne metode, da pravilno identificira kemikalije, ki nimajo lastnosti, zaradi katere so preskušane.

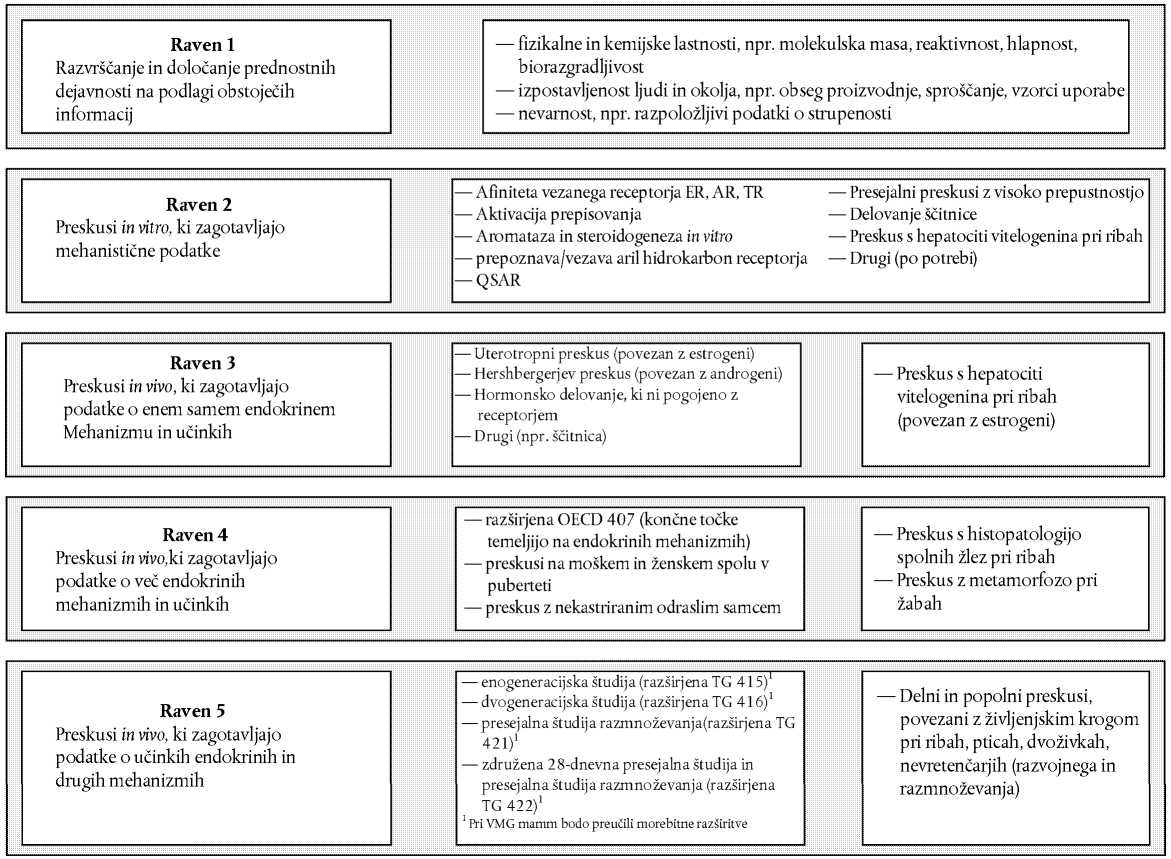
Preskusna kemikalija pomeni vsako snov ali zmes, preskušeno s to preskusno metodo.

Validacija je znanstven postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

Dodatek 2

Opomba: Dokument je pripravil sekretariat programa preskusnih smernic na podlagi sporazuma, sprejetega na 6. srečanju delovne skupine za EDTA.

Temeljni okvir OECD za preskušanje in oceno kemikalij, ki motijo delovanje endokrinih žlez



VMG mamm: Skupina za upravljanje validacije na področju preskusov na sesalcih in njihovega ocenjevanja.

▼**M5**

OPOMBE K OKVIRU:

Opomba 1: Vstop na vseh ravneh in izstop z vseh ravni je mogoč in odvisen od obstoječih potreb po informacijah zaradi ocene nevarnosti in tveganja.

Opomba 2: Na ravni 5 bi moral ekotoksikološki vidik vključevati končne točke, ki kažejo na mehanizme škodljivih učinkov in morebitno škodo za populacijo.

Opomba 3: Če večmodalni model zajema več preskusov ene končne točke, ta model zamenja uporabo teh preskusov ene končne točke.

Opomba 4: Kemikalije je treba ocenjevati vsako posebej in pri tem upoštevati razpoložljive informacije ter funkcijo ravni okvira.

Opomba 5: V času nastanka tega dokumenta okvir še ni izpopolnjen. Na ravneh 3, 4 in 5 vključuje preskuse, ki so na voljo ali pa še v postopku validacije. Slednji so vključeni začasno. Ko bodo razviti in validirani, bodo uradno dodani v okvir.

Opomba 6: Za raven 5 se ne sme šteti, da vključuje samo končne preskuse. Preskusi, vključeni na tej ravni, prispevajo k splošni oceni nevarnosti in tveganja.

VIRI

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th–11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman R.I. (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray L.E. Jr., Furr J. and Ostby J.S. (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W., Zeiger E., Walker M., Ashby J., Onyon L., Gray, Jr., L.E. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269.

▼M5

(8) Owens W., Gray L.E., Zeiger E., Walker M., Yamasaki K., Ashby J., Jacob E. (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

(9) Korenchevsky V. (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J 26:413–422.

(10) Korenchevsky V., Dennison M., Schalit R. (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J 26:1306–1314.

(11) Eisenberg E., Gordan G.S. (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

(12) Eisenberg E., Gordan G.S., Elliott H.W. (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

(13) Hershberger L., Shipley E., Meyer R. (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

(14) Hilgar A.G., Vollmer E.P. (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman R.I. (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

(16) Massaro E.J. (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p. 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. Septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (UL L 276, 20.10.2010, str. 33).

(27) Naslednja poglavja te priloge:

B.1 bis, Akutna oralna toksičnost – postopek s točno določenim odmerkom.

B.1 tris, Akutna oralna toksičnost – metoda razredov akutne toksičnosti.

▼M5

B.56 RAZŠIRJENA ENOGENERACIJSKA ŠTUDIJA STRUPENOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD št. 443 (2012). Temelji na predlogu tehničnega odbora za oceno varnosti kemikalij v kmetijstvu (ACSA) Inštituta za zdravstvene in okoljske vede (HESI) Mednarodnega inštituta za znanost o življenju (ILSI) za razširjeno enogeneracijsko študijo strupenosti za razmnoževanje v življenjskem obdobju potomcev prve generacije (F_1), kakor je objavljen v Cooper et al., 2006 (1). Narejene so bile številne izboljšave načrta študije in dodana so bila pojasnila, da bi zagotovili prožnost in poudarili pomen izhajanja iz obstoječega znanja in ugotovitev ob opazovanju živih živali, ki se uporabijo za usmerjanje in prilagajanje preskušanja. Ta preskusna metoda obsega podroben opis izvajanja razširjene enogeneracijske študije strupenosti za razmnoževanje. Preskusna metoda opisuje tri kohorte živali F_1:

Kohorta 1: oceni končne točke razmnoževanja/razvoja; ta kohorta bo morda razširjena na generacijo F_2.

Kohorta 2: oceni morebiten učinek izpostavljenosti kemikaliji na živčni sistem v razvoju.

Kohorta 3: oceni morebiten učinek izpostavljenosti kemikaliji na imunski sistem v razvoju.

2. Odločitev glede ocenjevanja druge generacije in opustitve kohorte za razvojno nevrotoksičnost in/ali kohorte za razvojno imunotoksičnost bi morala temeljiti na obstoječem znanju o kemikaliji, ki se vrednoti, in potrebah različnih regulativnih organov. Namen te preskusne metode je zagotoviti podrobnosti o izvajanju študije in načinih vrednotenja vsake od kohort.

3. Postopek za odločitev o notranjih sprožilcih za produkcijo druge generacije je opisan v Smernici OECD št. 117 (39) za regulativne organe, ki uporabljajo notranje sprožilce.

ZAČETNI PREUDARKI IN CILJI

4. Glavni cilj razširjene enogeneracijske študije o strupenosti za razmnoževanje je vrednotenje določenih življenjskih obdobij, ki niso zajeta v drugih vrstah študij strupenosti in preskušanje za učinke, ki bi lahko bili posledica izpostavljenosti kemikalijam v pred- in poporodnem obdobju. Pri končnih točkah razmnoževanja se priporoča, da se najprej, in ko je to mogoče, za odkrivanje učinkov na ženske in moške razmnoževalne organe uporabijo informacije iz študij s ponavljajočimi se odmerki (vključno s presejalnimi študijami za strupenost za razmnoževanje, npr. Smernica za preskušanje OECD št. 422 (32)), ali kratkotrajnih presejalnih študij za povzročitelje endokrinih motenj (npr. uterotropni preskus – preskusna metoda B.54 (36), in Hershbergerjev preskus – preskusna metoda B.55 (37)). Mednje lahko sodijo spermatogeneza (histopatologija mod) pri samcih ter pojatveni cikli, štetje foliklov/zorenje oocitov in celovitost jajčnikov (histopatologija) pri samicah. Razširjena enogeneracijska študija strupenosti za razmnoževanje služi kot preskus za končne točke razmnoževanja, pri katerih so potrebni interakcija samcev in samic, samice z zarodkom in samice s potomci ter generacija F_1 do obdobja po spolni zrelosti (glej Smernico OECD št. 151, ki podpira to preskusno metodo (40)).

▼**M5**

5. Preskusna metoda je zasnovana tako, da zagotavlja vrednotenje pred- in poporodnih učinkov kemikalij na razvoj, pa tudi temeljito vrednotenje sistemske strupenosti pri brejih in doječih samicah ter mladih in odraslih potomcih. S podrobnim proučevanjem ključnih končnih točk razvoja, kot so sposobnost potomcev za preživetje, zdravje in razvojni status ob rojstvu ter fizični in funkcionalni razvoj do odraslosti, naj bi se opredelili določeni tarčni organi pri potomcih. Poleg tega bo študija zagotovila in/ali potrdila informacije o učinkih preskusne kemikalije na celovitost in zmogljivost moških in ženskih razmnoževalnih sistemov. Še posebej, vendar ne izključno, so obravnavani naslednji parametri: funkcija spolnih žlez, pojatveni cikel, zorenje semena v obmodku, vedenje pri parjenju, spočetje, brejost, kotitev in laktacija. Poleg tega bodo informacije, pridobljene na podlagi ocen razvojne nevrotoksičnosti in/ali razvojne imunotoksičnosti, opredelile morebitne učinke v teh sistemih. Podatki, pridobljeni s temi preskusi, bi morali omogočiti določanje vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL), najnižjih vrednosti z opaženim škodljivim učinkom (LOAEL) in/ali primerjalnih odmerkov za različne končne točke in/ali biti uporabljeni za opredelitev učinkov, ugotovljenih v prejšnjih študijah s ponavljajočim se odmerkom, in/ali služiti kot smernica za nadaljnje preskušanje.

6. Shema protokola je predstavljena na sliki 1. Preskusna kemikalija se daje neprekinjeno v stopnjevanih odmerkih več skupinam spolno zrelih samcev in samic. Ta generacija staršev (P) prejema odmerke v določenem obdobju pred parjenjem (obdobje je določeno na podlagi razpoložljivih informacij za preskusno kemikalijo, vendar mora trajati vsaj dva tedna) in v dvotedenskem obdobju parjenja. Starševski (P) samci nadalje prejemajo odmerke vsaj do odstavitve potomcev F_1. Odmerke naj bi prejemali vsaj 10 tednov. Če je treba pojasniti učinke na razmnoževanje, lahko odmerke prejemajo tudi dalj časa. Tretiranje starševskih (P) samic se nadaljuje med brejostjo in laktacijo do usmrtitve po odstavitvi njihovih potomcev (tj. 8–10 tednov tretiranja). Potomci F_1 so s preskusno kemikalijo nadalje tretirani od odstavitve do odraslosti. Če se ocenjuje druga generacija (glej Smernico OECD št. 117 (39)), se potomce F_1 še naprej tretira do odstavitve potomcev F_2 ali zaključka študije.

7. Na vseh živalih se izvajajo klinična opazovanja in patološki pregledi za znake strupenosti s posebnim poudarkom na celovitosti in zmogljivosti moških in ženskih razmnoževalnih sistemov ter na zdravju, rasti, razvoju in delovanju potomcev. Ob odstavitvi so izbrani potomci razdeljeni v določene podskupine (kohorte 1–3, glej odstavka 33 in 34 ter sliko 1) zaradi nadaljnjih preiskav, vključno s spolno zrelostjo, celovitostjo in delovanjem razmnoževalnega organa, vedenjskimi in nevrološkimi končnimi točkami ter delovanjem imunskega sistema.

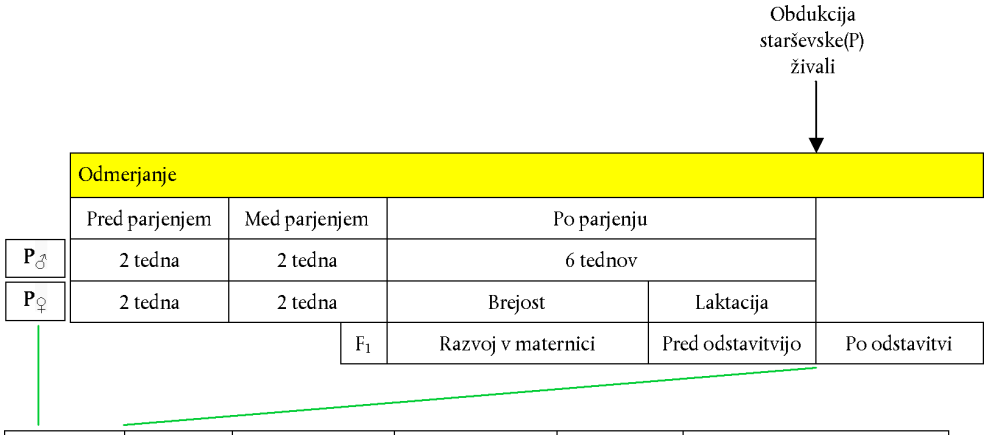
8. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in premisleke iz smernice OECD št. 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (34).

▼M5

9. Ko bo na voljo dovolj študij za ugotavljanje učinka tega novega načrta študije, bo opravljen pregled preskusne metode, ki bo ob upoštevanju pridobljenih izkušenj po potrebi spremenjena.

Slika 1

Shema razširjene enogeneracijske študije strupenosti za razmnoževanje



Starševska generacija	Kohorta	Oznaka	Živali/kohorta	Spolna zrelost	Približna starost ob obdukciji (v tednih)
Cilj je 20 legel na skupino	1A	Za razmnoževanje	20 M + 20 Ž	Da	13
	1B	Za razmnoževanje	20 M + 20 Ž	Da	14 ali 20–25, če je sprožena
	2A	Nevrotoksičnost	10 M + 10 Ž @	Da	11-12
	2B	Nevrotoksičnost	10 M + 10 Ž @	Ne	3
	3	Imunotoksičnost	10 M + 10 Ž @	Da	8
	Presežek	Rezerva		Ne	3

@ en na leglo in skupno predstavniki 20 legel, če je možno

OPIS METODE/PRIPRAVE NA PRESKUS

Živali

Izbira živalske vrste in seva

10. Vrsto za preskus strupenosti za razmnoževanje je treba skrbno izbrati ob upoštevanju vseh razpoložljivih informacij. Zaradi obsega osnovnih podatkov in primerljivosti s splošnimi preskusi strupenosti je priporočena vrsta običajno podgana; merila in priporočila v tej preskusni metodi se nanašajo na to vrsto. Če se uporabi druga vrsta, je treba izbiro utemeljiti in ustrezno spremeniti protokol. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo spontanih razvojnih napak se ne smejo uporabljati.

Starost, telesna teža in merila za vključitev

11. Uporabijo se zdravi starši, na katerih se še niso izvajali preskusni postopki. Proučiti je treba samce in samice; uporabijo se samice, ki še niso kotile in ki niso breje. Starši (P) naj bodo spolno zreli, ob začetku odmerjanja naj imajo podobno težo (v okviru spola), ob parjenju naj bodo približno enako stari (približno 90 dni) in naj bodo reprezentativni za vrsto in sev, uporabljena v študiji. Živali naj se prilagajajo vsaj 5 dni po prihodu. Živali se naključno dodelijo v kontrolne in tretirane skupine tako, da bodo povprečne telesne teže med skupinami primerljive (tj. ± 20 % srednje vrednosti).

▼M5

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

12. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi naj bo 22 °C (± 3 °C). Relativna vlažnost naj bo med 30 in 70 %, pri čemer je najprimernejše območje med 50 in 60 %. Umetna osvetlitev naj bo nastavljena na 12 ur svetlobe, 12 ur teme. Uporablja se lahko običajna laboratorijska prehrana z neomejeno količino pitne vode. Posebno pozornost je treba nameniti vsebnosti fitoestrogenov v prehrani, saj lahko njihova visoka raven vpliva na nekatere končne točke razmnoževanja. Priporoča se uporaba standardizirane prehrane z odprto formulo, v kateri so bile v skladu s priporočili zmanjšane količine estrogenih kemikalij (2) (30). Na izbiro prehrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, kadar se daje po tej metodi. Preveriti je treba vsebnost, homogenost in stabilnost preskusne kemikalije v prehrani. Hrano in pitno vodo je treba redno analizirati za kontaminante. Vzorce vsake serije prehrane, uporabljene med študijo, je treba shraniti pod ustreznimi pogoji (npr. zamrznjene pri – 20 °C) do zaključka poročila, če bi bilo treba na podlagi rezultatov opraviti nadaljnjo analizo sestavin prehrane.

13. Živali je treba v kletke namestiti v manjših skupinah istega spola in iz iste tretirane skupine. Zaradi izogibanja poškodbam (npr. samcev po obdobju parjenja) se lahko namestijo tudi posamično. Parjenje naj se izvaja v kletkah, ki so primerne za ta namen. Po dokazu o kopulaciji se domnevno breje samice namestijo ločeno v kletke za kotitev ali kletke za matere, kjer imajo na voljo ustrezen in določen material za izdelavo gnezda. Legla so nastanjena s svojimi materami do odstavitve. Živali F_1 naj bi bile od odstavitve do usmrtitve nameščene v majhnih skupinah istega spola in tretirane skupine. Če je to znanstveno upravičeno, so lahko živali nameščene posamično. Raven fitoestrogenov v izbrani stelji naj bo kar najmanjša.

Število in identifikacija živali

14. Običajno naj bi bilo v vsaki preskusni in kontrolni skupini zadostno število sparjenih parov, da je za vsako skupino odmerka brejih vsaj 20 samic. Cilj je dovolj brejih samic, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala snovi za vplivanje na plodnost, brejost in materinsko obnašanje starševske (P) generacije ter rast in razvoj potomcev F_1 od spočetja do zrelosti. Če zaželeno število brejih živali ni doseženo, študija s tem torej ni nujno ovržena in je potrebno vrednotenje vsakega primera posebej ob upoštevanju morebitne vzročne povezave s preskusno kemikalijo.

15. Pred začetkom odmerjanja se vsaki starševski (P) živali dodeli edinstvena identifikacijska številka. Če je iz preteklih podatkov laboratorija razvidno, da velik delež samic morda ne bo imel rednih (4- ali 5-dnevnih) pojatvenih ciklov, se priporoča ocena pojatvenih ciklov pred pričetkom tretiranja. Skupina se lahko tudi poveča in se tako zagotovi, da bo imelo ob začetku tretiranja v vsaki skupini vsaj 20 samic redne (4- ali 5-dnevne) pojatvene cikle. Vsi potomci F_1 se označijo z edinstvenimi oznakami, ko so novorojene živali prvič pregledane na poporodni dan 0 ali 1. poporodni dan. Ves čas trajanja študije je treba voditi evidenco z navedbo o poreklu zaroda za vse živali F_1 in, kadar je primerno, živali F_2.

▼M5

Preskusna kemikalija

Razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji

16. Pregled obstoječih informacij je pomemben zaradi odločitev o načinu dajanja, izbiri nosilca, izbiri vrste živali, izbiri odmerkov in morebitnih spremembah urnika odmerjanja. Zato je treba pri načrtovanju razširjene enogeneracijske študije strupenosti za razmnoževanje upoštevati vse ustrezne razpoložljive informacije o preskusni kemikaliji, tj. fizikalno-kemijske lastnosti, toksikokinetiko (vključno s presnovo, značilno za vrsto), toksikodinamične lastnosti, razmerja med strukturo in aktivnostjo, presnovne procese *in vitro*, rezultate predhodnih študij strupenosti in zadevne informacije o strukturnih analogih. Predhodne informacije o absorpciji, porazdelitvi, presnovi in izločanju ter bioakumulaciji je mogoče pridobiti na podlagi kemijske sestave, fizikalno-kemijskih podatkov, obsega študij vezave na plazemske beljakovine ali toksikokinetičnih študij, rezultati študij strupenosti pa zagotavljajo dodatne informacije, npr. o vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov (NOAEL), presnovi ali nastajanju presnove.

Upoštevanje podatkov o toksikokinetiki

17. Čeprav niso zahtevani, so podatki o toksikokinetiki iz predhodno izvedenih študij za ugotavljanje območja ali drugih študij izredno koristni pri načrtovanju študije, izbiri velikosti odmerkov in razlagi rezultatov. Zlasti koristni so podatki, ki: 1) preverjajo izpostavljenost razvijajočih se zarodkov in mladičev preskusni kemikaliji (ali ustreznim metabolitom), 2) zagotavljajo oceno notranje dozimetrije in 3) ocenijo možnost nasičenosti kinetičnega procesa, odvisne od odmerka. Če so na voljo, je treba upoštevati tudi dodatne podatke o toksikokinetiki, kot so profili presnovkov, časovni poteki koncentracije itd. Dodatne podatke o toksikokinetiki je mogoče zbrati tudi med glavno študijo, če to ne moti zbiranja in razlage končnih točk glavne študije.

Na splošno je pri načrtovanju razširjene enogeneracijske študije strupenosti za razmnoževanje koristen naslednji podatkovni niz o toksikokinetiki:

— pozna brejost (npr. 20. dan brejosti) – kri matere in kri zarodka,

— sredina obdobja laktacije (10. poporodni dan) – kri matere, kri mladiča in/ali mleko,

— zgodnje obdobje po odstavitvi (npr. 28. poporodni dan) – vzorci krvi odstavljenih živali.

Pri določanju določenih analitov (npr. matične kemikalije in/ali metabolitov) in sheme vzorčenja je potrebna prožnost. Število in čas odvzema vzorcev na določeni dan vzorčenja sta na primer odvisna od načina izpostavljenosti in predhodnega poznavanja toksikokinetičnih lastnosti pri nebrejih živalih. Pri študijah o prehrani zadošča vzorčenje ob enem samem doslednem času vsak dan vzorčenja, pri odmerjanju z gavažo pa bo morda potrebno vzorčenje tudi ob drugih časih, da bi dobili boljšo oceno območja notranjih odmerkov. Ni pa potrebno pripraviti celotnega časovnega poteka koncentracije na kateri koli dan vzorčenja. Po potrebi se lahko za analizo zarodkov in novorojenih živali podatke o krvi združi po spolu znotraj legel.

▼M5

Način dajanja kemikalije

18. Pri izbiri načina dajanja je treba upoštevati načine, ki so najpomembnejši za izpostavljenost pri ljudeh. Čeprav je protokol zasnovan za dajanje preskusne kemikalije s hrano, ga je mogoče spremeniti za dajanje na druge načine (pitna voda, gavaža, vdihavanje, skozi kožo), odvisno od lastnosti kemikalije in potrebnih informacij.

Izbira nosilca

19. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem nosilcu. Priporoča se, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodne raztopine/suspenzije, nato pa raztopine/suspenzije v olju (npr. koruznem). V primeru nosilcev, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega nosilca. Uporabi nosilcev z morebitno intrinzično strupenostjo se je treba izogibati (npr. acetonu, dimetilsulfoksidu). Določiti je treba stabilnost preskusne kemikalije v nosilcu. Če se za lažje odmerjanje uporabi nosilec ali drug dodatek, je treba upoštevati naslednje lastnosti: učinke na absorpcijo, porazdelitev, presnovo ali zadrževanje preskusne kemikalije; učinke na kemijske lastnosti preskusne kemikalije, ki bi lahko spremenili njene strupene lastnosti; in učinke na porabo vode ali hrane oziroma prehranjenost živali.

Izbira odmerka

20. Običajno naj bi študija obsegala vsaj tri velikosti odmerkov in hkratno kontrolo. Pri izbiri ustreznih velikosti odmerkov bi moral raziskovalec upoštevati vse razpoložljive informacije, vključno z informacijami o odmerjanju iz prejšnjih študij, podatke o toksikokinetiki pri brejih in nebrejih samicah, obseg prenosa z dojenjem ter ocene izpostavljenosti pri ljudeh. Če so na voljo podatki o toksikokinetiki, ki kažejo na od odmerka odvisno nasičenost toksikokinetičnih procesov, se je treba izogniti velikim odmerkom, ki očitno kažejo nasičenost, seveda če naj bi bila izpostavljenost pri ljudeh precej pod točko nasičenosti. V takih primerih naj bi bil največji odmerek na prevojni točki za prehod na nelinearne toksikokinetične lastnosti ali tik nad njo.

21. Če ustreznih podatkov o toksikokinetiki ni na voljo, naj bi velikosti odmerkov temeljile na učinkih strupenosti, razen kadar zaradi fizikalne/kemijske narave preskusne kemikalije to ni mogoče. Če velikosti odmerkov temeljijo na strupenosti, je treba največji odmerek izbrati z namenom, da se povzroči določena stopnja sistemske strupenosti, vendar ne smrti ali hudega trpljenja živali.

22. Padajoče zaporedje velikosti odmerkov je treba izbrati tako, da se pokažejo vse od odmerka odvisne reakcije in določi vrednost brez opaženih škodljivih učinkov (NOAEL) ali odmerke blizu meje zaznavnosti, na podlagi katerih bi bilo mogoče določiti primerjalni odmerek za najobčutljivejše končne točke. Da ne bi bilo prevelikega razpona med NOAEL in LOAEL, so pogosto optimalni dvakratni do štirikratni intervali. Pogosto je bolje dodati četrto preskusno skupino, kot uporabiti zelo velike intervale med odmerki (npr. več kot faktor 10).

23. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo se z živalmi v kontrolni skupini ravna enako kot z živalmi v preskusni skupini. Ta skupina je kontrolna skupina, ki ni tretirana ali je tretirana z nepravim nadomestkom, ali kontrolna skupina, tretirana le z nosilcem, če je ta uporabljen pri dajanju preskusne kemikalije. Če je uporabljen nosilec, mora kontrolna skupina prejeti količino nosilca, enako največji uporabljeni količini.

▼M5

Mejni preskus

24. Če pri odmerku najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan ni dokazov o strupenosti pri študijah s ponavljajočimi se odmerki ali se ne pričakuje strupenosti glede na podatke o strukturno in/ali presnovno sorodnih kemikalijah, ki kažejo na podobnost presnovnih lastnosti *in vivo*/*in vitro*, se šteje, da študija z uporabo več različnih velikosti odmerkov ni potrebna. V takih primerih se lahko razširjena enogeneracijska študija strupenosti za razmnoževanje izvede s kontrolno skupino in enim odmerkom najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan. Če se pri tej velikosti odmerka pojavijo dokazi o strupenosti za razmnoževanje in razvoj, bodo potrebne nadaljnje študije z manjšimi odmerki za opredelitev NOAEL. Ti preudarki o mejnem preskusu veljajo samo v primeru, ko na podlagi izpostavljenosti pri ljudeh ni razvidna potreba po večjem odmerku.

POSTOPKI

Izpostavljenost potomcev

25. Priporočen način dajanja je izpostavljenost s prehrano. Če se izvajajo študije dajanja z gavažo, je treba opozoriti, da mladiči preskusno kemikalijo običajno prejemajo posredno prek mleka, dokler se po odstavitvi ne prične neposredno odmerjanje. Pri študijah s prehrano ali pitno vodo dobijo mladiči preskusno kemikalijo tudi neposredno, ko se začnejo v zadnjem tednu obdobja dojenja samostojno prehranjevati. Če se v mleko izloča premalo preskusne kemikalije in če ni dokazov o neprekinjeni izpostavljenosti potomcev, je treba razmisliti o spremembi načrta študije. V tem primeru je treba proučiti možnost neposrednega odmerjanja mladičem med dojenjem na podlagi razpoložljivih informacij o toksikokinetiki, strupenosti za potomce ali spremembi biomarkerjev (3) (4). Pred pričetkom neposrednega odmerjanja doječim se mladičem je treba skrbno pretehtati prednosti in slabosti (5).

Urnik odmerjanja in dajanje odmerkov

26. Informacije o pojatvenem ciklu, histopatoloških preiskavah ženskega in moškega reproduktivnega trakta in/ali analizi semena iz mod/obmodka so morda na voljo iz prejšnjih ustrezno dolgih študij strupenosti s ponavljajočim se odmerkom. Trajanje tretiranja pred parjenjem v razširjeni enogeneracijski študiji strupenosti za razmnoževanje je torej usmerjeno v odkrivanje učinkov na spremembe delovanja, ki bi lahko motile vedenje pri parjenju in oploditev. Tretiranje pred parjenjem mora trajati dovolj dolgo, da se dosežejo stabilni pogoji izpostavljenosti pri starševskih (P) samcih in samicah. V večini primerov za oba spola zadošča dvotedensko tretiranje pred parjenjem. Pri samicah so v tem času zajeti 3–4 popolni pojatveni cikli, kar bi moralo zadoščati za odkrivanje morebitnih škodljivih učinkov na cikličnost. Pri samcih je to obdobje enakovredno obdobju, potrebnemu za prehod zorečih semenčic v obmodkih, in bi moralo zadoščati za odkrivanje učinkov na seme po fazi proizvodnje v modih (med zadnjimi fazami sprostitve spermatidov v obmodek in zorenjem semena v obmodku) pri parjenju. Ob usmrtitvi, ko sta načrtovani histopatologija mod in obmodka ter analiza parametrov semena, so starševski (P) samci in samci F_1 izpostavljeni vsaj en celotni proces spermatogeneze ((6) (7) (8) (9) in Smernica OECD št. 151 (40)).

▼M5

27. Scenarije izpostavljenosti samcev pred parjenjem je mogoče spremeniti, če so bili v prejšnjih študijah jasno ugotovljeni strupenost za moda (oslabitev spermatogeneze) ali učinki na celovitost in delovanje semena. Podobno je lahko pri samicah zaradi znanih učinkov preskusne kemikalije na pojatveni cikel in s tem na spolno dojemljivost utemeljena uporaba drugačnih scenarijev izpostavljenosti pred parjenjem. V posebnih primerih je lahko sprejemljivo, da se tretiranje starševskih (P) samic prične šele po brisu, pozitivnem na seme (glej Smernico OECD št. 151 (40)).

28. Po pričetku obdobja odmerjanja pred parjenjem je treba živali s preskusno kemikalijo tretirati neprekinjeno 7 dni na teden do obdukcije. Vse živali dobivajo odmerke po enaki metodi. Odmerjanje naj se nadaljuje med dvotedenskim obdobjem parjenja in pri starševskih (P) samicah med brejostjo in laktacijo do dneva usmrtitve po odstavitvi. Samce je treba tretirati enako do usmrtitve ob odstavitvi živali F_1. Pri obdukciji je treba dati prednost samicam, na katerih je treba opraviti obdukcijo na isti/podoben dan laktacije. Obdukcija samcev lahko poteka več dni, odvisno od zmogljivosti laboratorija. Če se neposredno odmerjanje ni pričelo že med dojenjem, se mora neposredno odmerjanje samcem in samicam F_1 pričeti ob odstavitvi in nadaljevati do načrtovane obdukcije, odvisno od kohorte.

29. Pri kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je nujno zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na običajno raven vnosa hrane ali porabe vode. Kadar se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeno metodo je treba določiti.

30. Pri kemikalijah, ki se dajejo z gavažo, naj količina enega danega odmerka tekočine običajno ne bi presegla 1 ml/100 g telesne teže (0,4 ml/100 g telesne teže je največja dovoljena količina za olje, npr. koruzno olje). Razen pri dražečih ali jedkih kemikalijah, ki pri višjih koncentracijah navadno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, da bi zagotovili konstantno količino pri vseh odmerkih. Odmerek je treba dati vsak dan približno ob istem času. Odmerek za posamezno žival je navadno izbran na podlagi nazadnje določene telesne teže živali, prilagodi pa se ga vsaj enkrat tedensko za odrasle samce in odrasle nebreje samice ter vsaka dva dni za breje samice in živali F_1 pred odstavitvijo in dva tedna po odstavitvi. Če podatki o toksikokinetiki kažejo na prenos preskusne kemikalije prek posteljice v majhnih količinah, bo morda treba v zadnjem tednu brejosti prilagoditi odmerek z gavažo, da mati ne bi prejela preveč strupenega odmerka. Na dan kotitve se samice ne smejo tretirati z gavažo ali na kakšen drugi način odmerjanja, pri katerem je treba ravnati z živaljo; bolje je, da samice na ta dan ne prejmejo preskusne kemikalije, kot da se zmoti postopek kotitve.

▼M5

Parjenje

31. Vsaka starševska (P) samica se namesti skupaj z naključno izbranim, nepovezanim samcem, ki prejema enako velikost odmerka (parjenje 1:1), dokler ne pride do kopulacije ali dokler ne mineta 2 tedna. Če ni dovolj samcev, na primer zaradi pogina samcev pred parjenjem, se lahko samci, ki so se že parili, sparijo (1:1) z drugimi samicami, tako da so vse samice sparjene. Dan 0 brejosti je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (je opažen vaginalni čep ali seme). Živali je treba ločiti takoj, ko so najdeni dokazi o kopulaciji. Če po dveh tednih ni prišlo do parjenja, je treba živali ločiti brez nadaljnje priložnosti za parjenje. Sparjeni pari morajo biti jasno označeni v podatkih.

Velikost legla

32. Četrti dan po skotitvi se lahko velikost vsakega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, da bi se dobilo, če je to mogoče, pet samcev in pet samic na leglo. Selektivna izločitev mladičev, npr. na podlagi telesne teže, ni primerna. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi jih bilo v vsakem zarodu po pet na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer, šest samcev in štiri samice).

Izbor mladičev za študije po odstavitvi (glej sliko 1)

33. Ob odstavitvi (okrog 21. poporodnega dne) se iz vseh razpoložljivih legel do 20 mladičev na vsako skupino odmerka in kontrolno skupino izbere za nadaljnje preiskave in vzdržuje do spolne zrelosti (razen če je preskušanje potrebno prej). Mladiči se izberejo naključno, vključiti pa se ne smejo očitni spački (živali s telesno težo, ki je več kot dva standardna odklona manjša od povprečne telesne teže mladičev iz zadevnega legla), saj najverjetneje ne bodo reprezentativni za tretirano skupino.

21. poporodni dan so izbrani mladiči F_1 naključno razporejeni v eno od treh kohort živali, kot sledi:

Kohorta 1 (1A in 1B) = Preskušanje strupenosti za razmnoževanje/razvoj

Kohorta 2 (2A in 2B) = Preskušanje razvojne nevrotoksičnosti

Kohorta 3 = Preskušanje razvojne imunotoksičnosti

Kohorta 1A: En samec in ena samica/leglo/skupino (20/spol/skupino): prednostni izbor za prvotno oceno učinkov na razmnoževalne sisteme in učinkov splošne strupenosti.

Kohorta 1B: En samec in ena samica/leglo/skupino (20/spol/skupino): prednostni izbor za nadaljnjo oceno sposobnosti razmnoževanja s parjenjem živali F_1, ko se ocenjuje (glej Smernico OECD št. 117 (39)), in za pridobivanje dodatnih histopatoloških podatkov v primeru domnevno strupenih snovi za razmnoževanje ali domnevnih povzročiteljev endokrinih motenj oziroma v primeru, ko so rezultati iz kohorte 1A dvoumni.

Kohorta 2A: skupno 20 mladičev na skupino (10 samcev in 10 samic na skupino; en samec ali ena samica na leglo), dodeljenih za preskušanje za nevrološko-vedenjske motnje, ki mu sledi nevrohistopatološka ocena kot odraslih.

Kohorta 2B: skupno 20 mladičev na skupino (10 samcev in 10 samic na skupino; en samec ali ena samica na leglo), dodeljenih za nevrohistopatološko oceno ob odstavitvi (21. ali 22. poporodni dan). Če živali ni dovolj, je treba dati prednost dodelitvi živali kohorti 2A.

▼M5

Kohorta 3: skupno 20 mladičev na skupino (10 samcev in 10 samic na skupino; en na leglo, če je mogoče). Morda bodo potrebni dodatni mladiči iz kontrolne skupine, ki bodo živali pozitivne kontrole v preskusu protitelesnega odziva na osnovi T-celic (TDAR) na 56. poporodni dan ± 3 dnevi.

34. Če v leglu ni dovolj mladičev za vse kohorte, ima prednost kohorta 1, saj jo je mogoče razširiti na produkcijo generacije F_2. V primeru posebnih okoliščin, npr. če je kemikalija domnevno strupena za življenje, imunski sistem ali razmnoževanje, se lahko kateri koli kohorti dodelijo dodatni mladiči. Ti mladiči se lahko uporabijo za preiskave ob različnih časovnih točkah ali za ocenjevanje dodatnih končnih točk. Na mladičih, ki niso dodeljeni v kohorte, se bodo opravile klinične biokemijske preiskave (odstavek 55) in opravljena bo makroskopska obdukcija (odstavek 68).

Drugo parjenje starševskih (P) živali

35. Za starševske (P) živali drugo parjenje običajno ni priporočeno, saj se zaradi tega izgubijo pomembne informacije o številu vgnezditev (in s tem podatki o izgubah po vgnezditvi in ob kotitvi) za prvo leglo. Potreba po preverjanju ali pojasnjevanju učinka pri izpostavljenih samicah bi bila bolje izpolnjena z razširitvijo študije na parjenje generacije F_1. Vendar pa drugo parjenje starševskih (P) samcev z netretiranimi samicami vedno predstavlja možnost, da se razjasnijo dvoumni rezultati ali nadalje opredelijo učinki na plodnost, ugotovljeni pri prvem parjenju.

OPAZOVANJA ŽIVIH ŽIVALI

Klinična opazovanja

36. Pri starševskih (P) živalih in izbranih živalih F_1 se splošno klinično opazovanje opravi enkrat dnevno. V primeru odmerjanja z gavažo je treba klinična opazovanja izvesti pred odmerjanjem in po njem (za morebitne znake strupenosti, povezane z najvišjo koncentracijo plazme). Zabeležijo se bistvene vedenjske spremembe, znaki težke ali podaljšane kotitve in vsi znaki strupenosti. Dvakrat dnevno, ob koncu tedna pa enkrat dnevno, je treba vse živali opazovati za ugotavljanje hude strupenosti, obolevnosti in smrtnosti.

37. Poleg tega se podrobnejši pregled vseh starševskih (P) živali in živali F_1 (po odstavitvi) izvede enkrat tedensko in se lahko primerno opravi takrat, ko se žival tehta, zaradi česar se zmanjša stres ob ravnanju z njo. Opazovanja je treba skrbno izvajati in beležiti z uporabo sistemov ocenjevanja, ki jih določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da so variacije v preskusnih pogojih čim manjše. Pozornost je med drugim treba posvetiti vsem spremembam na koži, dlaki, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenje, piloerekcija, velikost zenic, nenormalen vzorec dihanja). Prav tako je treba zabeležiti spremembe vedenja, drže in odzivanja na ravnanje, pa tudi navzočnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipije (npr. čezmerno čiščenje, nenehno vrtenje v krogih) ali nenormalnega vedenja (npr. samopohaba, zadenjska hoja).

▼M5

Telesna teža in poraba hrane/vode

38. Starševske (P) živali se stehtajo prvi dan dajanja odmerkov in potem najmanj enkrat tedensko. Poleg tega se starševske (P) samice med laktacijo tehtajo na iste dneve, kot poteka tehtanje mladičev iz njihovega zaroda (glej odstavek 44). Vse živali F_1 se stehtajo posamično ob odstavitvi (21. poporodni dan) in potem najmanj enkrat tedensko. Telesna teža se zabeleži tudi na dan nastopa pubertete (končano ločevanje prepucija ali pojav odprtja nožnice). Vse živali se stehtajo ob usmrtitvi.

39. Med študijo se poraba hrane in vode (v primeru dajanja preskusne kemikalije z vodo) beleži vsaj enkrat tedensko na iste dneve kot telesna teža živali (razen med obdobjem sobivanja). Poraba hrane vsake kletke živali F_1 se beleži tedensko, začne pa se z dodelitvijo zadevni kohorti.

Pojatveni cikli

40. Predhodne informacije o učinkih na pojatveni cikel, povezanih s preskusno kemikalijo, so morda na voljo že iz prejšnjih študij strupenosti s ponavljajočim se odmerkom in se lahko uporabijo pri načrtovanju protokola za določeno preskusno kemikalijo za razširjeno enogeneracijsko študijo strupenosti za razmnoževanje. Običajno se ocenjevanje pojatvene cikličnosti (s citologijo nožnice) začne hkrati s tretiranjem in nadaljuje do potrditve o parjenju ali konca dvotedenskega obdobja parjenja. Če so bili pri samicah opravljeni presejalni preskusi glede normalnosti pojatvenih ciklov pred tretiranjem, je nadaljevanje jemanja brisa nožnice koristno tudi po začetku tretiranja; če pa obstajajo pomisleki glede splošnih učinkov ob začetku tretiranja (na primer izrazito zmanjšana poraba hrane na začetku), se lahko živalim omogoči največ dvotedensko obdobje prilagajanja na tretiranje pred začetkom dvotedenskega obdobja jemanja brisov, ki mu sledi parjenje. Če se s tem obdobje tretiranja samic podaljša (tj. na štiritedensko tretiranje pred parjenjem), bi bilo morda treba nabaviti mlajše živali in podaljšati obdobje tretiranja samcev pred parjenjem. Med jemanjem celic nožnice/maternične vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do namišljene brejosti (10) (11).

41. Za vse samice F_1 v kohorti 1A je brise nožnice treba pregledovati dnevno, po pojavu odprtja nožnice do prvega brisa s poroženelimi celicami, da bi določili časovni interval med tema dvema dogodkoma. Pojatvene cikle vseh samic F_1 v kohorti 1A je prav tako treba spremljati dva tedna, s pričetkom okoli 75. poporodnega dne. Če bo potrebno parjenje generacije F_1, je treba citologijo nožnice v kohorti 1B spremljati od časa parjenja do odkritja dokazov o parjenju.

Parjenje in brejost

42. Poleg standardnih končnih točk (npr. telesna teža, poraba hrane, klinična opazovanja vključno s preverjanjem smrtnosti/obolevnosti) je treba zabeležiti datume parjenja, datum oploditve in datum kotitve ter izračunati predkoitalni interval (od parjenja do oploditve) in trajanje brejosti (od oploditve do kotitve). V času pričakovane kotitve je treba starševske (P) samice skrbno pregledati za morebitne znake distocije. Morebitne nepravilnosti pri gnezdenju ali dojenju je treba zabeležiti.

▼M5

43. Dan kotitve je dan laktacije 0 za mater in poporodni dan 0 za potomce. Namesto tega lahko vse primerjave temeljijo tudi na postkoitalnem obdobju, da ne bi prišlo do zamenjave podatkov o poporodnem razvoju zaradi razlik v času trajanja brejosti; treba pa je zabeležiti tudi čas kotitve. To je pomembno zlasti, kadar preskusna kemikalija vpliva na trajanje brejosti.

Parametri pri potomcih

44. Vsak zarod je treba proučiti čim prej po skotitvi (poporodni dan 0 ali 1. poporodni dan) ter ugotoviti število in spol mladičev, število mrtvorojenih in živorojenih živali ter navzočnost večjih nepravilnosti (navzven vidne nepravilnosti, vključno z razcepljenim nebom, podkožne krvavitve, neobičajna barva ali struktura kože, prisotnost popkovine, pomanjkanje mleka v želodcu, prisotnost suhih izločkov). Poleg tega mora biti v okviru prve klinične preiskave novorojenih živali opravljena kvalitativna ocena telesne temperature, aktivnosti in odzivanja na ravnanje. Mladiče, ki so najdeni mrtvi na poporodni dan 0 ali pozneje, je treba proučiti glede možnih okvar in vzroka smrti. Žive mladiče je treba prešteti in posamično stehtati na poporodni dan 0 ali 1. poporodni dan ter redno tehtati pozneje, npr. vsaj na 4., 7., 14. in 21. poporodni dan. Primerno starosti živali je treba klinične preglede ponoviti ob tehtanju potomcev oziroma pogosteje, če so bile ob kotitvi podane ugotovitve v zvezi s posameznimi primeri. Opaženi znaki lahko vključujejo, niso pa omejeni na zunanje nepravilnosti, spremembe na koži, dlaki, očeh in sluznicah, pojav sekrecije in ekskrecije ter delovanje avtonomnega živčevja. Prav tako je treba zabeležiti spremembe vedenja, drže in odzivanja na ravnanje, pa tudi pojav kloničnih ali toničnih gibov, stereotipije ali nenormalnega vedenja.

45. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti vsaj enkrat med poporodnim dnem 0 in 4. poporodnim dnem. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (12). Mladiče moškega spola je treba za prisotnost bradavic in bradavičnih kolobarjev pregledati na 12. ali 13. poporodni dan.

46. Vsi izbrani mladiči F_1 se dnevno pregledajo za ločitev prepucija od glavice penisa pri samcih oziroma pojav odprtja nožnice pri samicah, in sicer pred pričakovanim dnem teh končnih točk, da se ugotovi, ali do spolne zrelosti prihaja zgodaj. Morebitne nepravilnosti genitalnih organov, kot so trajni vaginalni filament, hipospadija ali razcepljen penis, je treba zabeležiti. Spolna zrelost živali F_1 se primerja s fizičnim razvojem z določitvijo starosti in telesne teže ob ločitvi prepucija od glavice spolnega uda pri samcih oziroma pojavu vaginalne odprtine pri samicah (13).

Ocena morebitne razvojne nevrotoksičnosti (kohorti 2A in 2B)

47. Za oceno nevrotoksičnosti je treba uporabiti deset samcev in deset samic kohorte 2A ter deset samcev in deset samic kohorte 2B (za vsako kohorto: 1 samec ali 1 samica na leglo; iz vsakega legla je naključno izbran vsaj 1 mladič). Pri vsaki živali kohorte 2A se opravi ocena slušnega dražljaja, sklop funkcionalnih opazovanj, ocena motorične aktivnosti (glej odstavke 48–50) in nevropatološka ocena (glej odstavka 74–75). Prizadevati si je treba, da so variacije pri vseh preskusnih pogojih čim manjše in niso sistematično povezane s tretiranjem. Med spremenljivkami, ki lahko

▼M5

vplivajo na vedenje, so jakost zvoka (npr. občasni hrup), temperatura, vlaga, osvetlitev, vonji, čas dneva in motnje iz okolja. Rezultate preskusov nevrotoksičnosti je treba razlagati v povezavi z ustreznimi referenčnimi razponi preteklih kontrol. Živali kohorte 2B je treba uporabiti za nevropatološko oceno 21. ali 22. poporodni dan (glej odstavka 74–75).

48. Preskus slušnega dražljaja se opravi 24. poporodni dan (± 1 dan) z živalmi v kohorti 2A. Izvajanje preskušanja na dan preskušanja mora biti uravnoteženo po tretiranih in kontrolnih skupinah. Vsako preskušanje je sestavljeno iz 50 preskusov. Pri izvajanju preskusa slušnih dražljajev je treba določiti srednjo amplitudo odziva pri vsakem sklopu po 10 preskusov (5 sklopov po 10 preskusov), pri čemer morajo biti preskusni pogoji optimizirani za habituacijo znotraj preskušanja. Ti postopki morajo biti v skladu s preskusno metodo B.53 (35).

49. Ob primernem času med 63. in 75. poporodnim dnem se pri živalih iz kohorte 2A opravi sklop funkcionalnih opazovanj in avtomatizirani preskus motorične aktivnosti. Ti postopki morajo biti v skladu s preskusnima metodama B.43 (33) in B.53 (35). Sklop funkcionalnih opazovanj vključuje temeljit opis videza, vedenja in funkcionalne neokrnjenosti subjekta. To se oceni z opazovanjem v domači kletki, po prenosu na standardno mesto (na terenu), kjer se žival prosto giblje, in z gibalnimi preskusi. Preskušanje naj se izvaja od najmanj do najbolj interaktivnega. Seznam meril je naveden v Dodatku 1. Vse živali morajo skrbno opazovati usposobljeni opazovalci, ki niso seznanjeni s tretiranjem živali, in sicer po standardiziranih postopkih, s katerimi se zmanjša variabilnost opazovalca. Če je to mogoče, naj živali v zadevnem preskusu vrednoti isti opazovalec. Če to ni mogoče, je potreben dokaz o enaki zanesljivosti opazovalcev. Za vsak parameter v sklopu vedenjskega preskušanja je treba uporabiti izrecne operativno opredeljene lestvice in merila za točkovanje. Če je mogoče, je treba razviti objektivna kvantitativna merila za opazovane končne točke, ki vključujejo subjektivno razvrščanje. Za motorično aktivnost se vsaka žival preskuša posamično. Preskušanje mora biti dovolj dolgo, da se za kontrolne vzorce dokaže habituacija znotraj preskušanja. Motorično aktivnost je treba spremljati z avtomatizirano napravo za beleženje aktivnosti, ki lahko odkrije tako zmanjšanje kot tudi povečanje aktivnosti, (tj. osnovna aktivnost, kot jo izmeri naprava, ne sme biti tako nizka, da ni mogoče zaznati zmanjšanja, in ne tako visoka, da ni mogoče zaznati povečanja aktivnosti). Vsako napravo je treba preskusiti s standardnimi postopki, da je zagotovljeno čim bolj zanesljivo delovanje naprav vse dni. Preskušanje tretiranih skupin mora biti v največji možni meri uravnoteženo med napravami. Tretirane skupine morajo biti uravnoteženo razporejene po časih preskušanja, da se prepreči zavajajoči učinek cirkadianega ritma aktivnosti.

50. Če so v skladu z obstoječimi informacijami potrebni drugi funkcionalni preskusi (npr. senzorični, socialni, kognitivni), jih je treba vključiti, ne da bi bila pri tem ogrožena celovitost drugih vrednotenj v okviru študije. Če se ti preskusi izvajajo na istih živalih kot standardno preskušanje slušnega dražljaja, sklop funkcionalnih opazovanj in preskušanje motorične aktivnosti, je treba pripraviti časovni razpored različnih preskusov, da bi bila celovitost teh preskusov čim manj ogrožena. Dopolnilni postopki so lahko posebno koristni, kadar empirična opazovanja, pričakovani učinki ali mehanizem/način delovanja kažejo posebno vrsto nevrotoksičnosti.

▼M5

Ocena morebitne razvojne nevrotoksičnosti (kohorta 3)

51. Na 56. poporodni dan (± 3 dni) je treba 10 samcev in 10 samic iz kohorte 3 iz vsake tretirane skupine (1 samec ali 1 samica na leglo; iz vsakega legla je naključno izbran vsaj 1 mladič) uporabiti v preskusu protitelesnega odziva na osnovi T-celic (TDAR), tj. primarni odziv protitelesa razreda IgM na antigen na osnovi T-celic, kot so SRBC (ovčje rdeče krvničke) ali KLH (hemocianin iz morskega polža), v skladu z veljavnimi postopki preskušanja imunotoksičnosti (14) (15). Odziv je mogoče ovrednotiti s štetjem celic, ki delajo plake (celice PFC), v vranici, ali določanjem titra protitelesa IgM, značilnega za SRBC ali KLH, v serumu s preskusom ELISA ob vrhuncu odziva. Vrhunec odziva je običajno štiri (odziv celic PFC) ali pet (preskus ELISA) dni po intravenozni imunizaciji. Če se primarni odziv protiteles preskuša s štetjem celic, ki delajo plake, ni treba vseh podskupin živali vrednotiti na isti dan, pod pogojem, da: so imunizacija in usmrtitev podskupin načrtovani tako, da se celice PFC prešteje ob vrhuncu odziva; je v podskupinah enako število potomcev moškega in ženskega spola iz vseh skupin z odmerkom, vključno s kontrolnimi skupinami; in so podskupine vrednotene približno ob isti poporodni starosti. Izpostavljenost preskusni kemikaliji se nadaljuje do dneva pred odvzemom vranic za preskus odziva celic PFC ali seruma za preskus ELISA.

Nadaljnja ocena morebitne strupenosti za razmnoževanje (kohorta 1B)

52. Živali iz kohorte 1B se lahko po potrebi tretirajo še po 90. poporodnem dnevu in parijo za produkcijo generacije F_2. Samce in samice iz iste skupine z odmerkom je treba namestiti skupaj (pri tem se je treba izogibati parjenju med sorojenci) do največ dva tedna, ki se začneta na 90. poporodni dan ali pozneje, vendar ne pozneje od 120. poporodnega dne. Postopki morajo biti podobni kot pri starševskih (P) živalih. Glede na tehtnost dokazov pa se legla morda lahko usmrtijo na 4. poporodni dan, namesto da bi se jih spremljalo do odstavitve ali še dlje.

OPAZOVANJA OB USMRTITVI

Klinična biokemija/hematologija

53. Pri starševskih (P) živalih je treba spremljati sistemske učinke. Ob usmrtitvi se desetim naključno izbranim starševskim (P) samcem in samicam na skupino z odmerkom, ki so se postili, vzamejo vzorci krvi z določenega mesta, ki se nato shranijo pod ustreznimi pogoji in na katerih se opravijo delne ali popolne hematološke preiskave, klinične biokemijske preiskave, preskusa za T4 in TSH ali drugi pregledi na podlagi profila znanih učinkov preskusne kemikalije (glej Smernico OECD št. 151 (40)). Pregledati je treba naslednje hematološke parametre: hematokrit, koncentracijo hemoglobina, število eritrocitov, skupno število levkocitov in diferencialno sliko levkocitov, število trombocitov in čas/potencial koagulacije krvi. Preiskave plazme ali seruma morajo vključevati: glukozo, skupni holesterol, sečnino, kreatinin, skupne beljakovine, albumin in najmanj dva encima, ki sta kazalnika hepatoceličnih učinkov (kot so alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, alkalna fosfataza, gamaglutamil transpeptidaza in sorbitol dehidrogenaza). Meritve dodatnih encimov in žolčnih kislin lahko včasih dajo koristne informacije. Poleg

▼M5

tega se lahko vsem živalim tudi odvzame kri in se shrani za morebitno poznejšo analizo, da se razjasnijo dvoumni učinki ali zberejo podatki o notranji izpostavljenosti. Če drugo parjenje starševskih (P) živali ni načrtovano, se vzorci krvi zberejo tik pred postopkom ob načrtovani usmrtitvi ali v sklopu le-tega. Če se živali ne usmrtijo, se vzorce krvi odvzame nekaj dni pred drugim parjenjem živali. Razen če je na podlagi obstoječih podatkov iz študij s ponavljajočim se odmerkom razvidno, da preskusna kemikalija ne vpliva na parameter, je treba pred usmrtitvijo opraviti analizo urina in ovrednotiti naslednje parametre: videz, količino, osmolalnost ali specifično težo, pH, beljakovine, glukozo, kri in krvne celice ter celični drobir. Odvzame se lahko tudi urin za spremljanje ekskrecije preskusne kemikalije in/ali metabolitov.

54. Pri živalih F_1 je treba spremljati tudi sistemske učinke. Ob usmrtitvi se desetim naključno izbranim samcem in samicam iz kohorte 1A na skupino z odmerkom, ki so se postili, vzamejo vzorci krvi z določenega mesta, ki se nato shranijo pod ustreznimi pogoji in na katerih se opravijo standardne klinične biokemijske preiskave, vključno z oceno serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4 in TSH), hematološke preiskave (skupno število in diferencialna slika levkocitov ter število eritrocitov) in analiza urina.

55. Na 4. poporodni dan se odvečne mladiče makroskopsko obducira in upoštevajo se meritve serumske koncentracije hormona ščitnice (T4). Po potrebi se zarodu odvzame kri novorojenih mladičev (4. poporodni dan) za biokemično analizo/analizo hormonov ščitnice. Za analizo T4 in TSH se kri odvzame tudi odstavljenim mladičem, ki se jih makroskopsko obducira na 22. poporodni dan (mladiči F_1, ki niso izbrani za kohorte).

Parametri semena

56. Parametre semena se meri pri vseh samcih generacije P, razen če obstajajo podatki, ki dokazujejo, da so v 90-dnevni študiji parametri semena nespremenjeni. Pregled parametrov semena se opravi pri vseh samcih iz kohorte 1A.

57. Ob usmrtitvi se pri vseh starševskih (P) samcih in samcih F_1 (kohorta 1A) zabeleži teža moda in obmodka. Vsaj eno modo in en obmodek se shrani za histopatološki pregled. Drugi obmodek se uporabi za štetje zalog semena v repu obmodka (16) (17). Poleg tega se odvzame seme iz repov obmodkov (ali semenovodov) z metodami, pri katerih so poškodbe za ovrednotenje gibljivosti in morfologije semena kar najmanjše (18).

58. Gibljivost semena je treba ovrednotiti takoj po usmrtitvi ali zabeležiti za poznejšo analizo. Odstotek progresivno gibljivega semena je treba subjektivno ali objektivno določiti z analizo gibanja s pomočjo računalnika (19) (20) (21) (22) (23) (24). Za morfološko ovrednotenje semena je treba vzorce semena iz obmodka (ali semenovoda) proučiti kot fiksirane ali mokre preparate (25) in najmanj 200 semenčic na vzorec razvrstiti kot normalne (glavica in srednji del/repek so videti normalno) ali nenormalne. Primeri morfoloških anomalij semena vključujejo spojitev, ločene glavice ter glavice in/ali repke nepravilnih oblik (26). Glavice nepravilne oblike ali velike glavice lahko kažejo na okvare pri sprostitvi spermatidov v obmodek.

59. Če se ob obdukciji zamrznejo vzorci semena, fiksirajo brisi in posnamejo posnetki za analizo gibljivosti semena (27), se lahko naknadno analizirajo le samci iz kontrolne skupine in skupin z velikim odmerkom. Če so opazni učinki, povezani s tretiranjem, je treba ovrednotiti tudi skupine z manjšim odmerkom.

▼M5

Makroskopska obdukcija

60. Ob usmrtitvi ali prezgodnji smrti se vse starševske (P) živali in živali F_1 makroskopsko obducirajo in makroskopsko pregledajo za odkrivanje kakršnih koli strukturnih anomalij ali patoloških sprememb. Posebno pozornost je treba posvetiti organom razmnoževalnega sistema. Mladiče, ki so humano usmrčeni med poginjanjem, in mrtve mladiče je treba zabeležiti in, če se ne macerirajo, proučiti glede možnih okvar in/ali vzroka smrti ter konzervirati.

61. Pri odraslih starševskih (P) samicah in samicah F_1 se na dan obdukcije pregleda bris nožnice, da se ugotovi faza pojatvenega cikla in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami razmnoževalnih organov. Maternice vseh starševskih (P) samic (in po potrebi samic F_1) se pregledajo glede navzočnosti in števila vgnezditev na način, ki nima negativnega vpliva na histopatološko ovrednotenje.

Teža organov in shranjevanje tkiv – odrasle starševske (P) živali in odrasle živali F_1

62. Po usmrtitvi se čim prej po seciranju, da ne pride do izsušitve, določita telesna teža in mokra teža v nadaljevanju navedenih organov vseh starševskih (P) živali in odraslih živali F_1 iz zadevnih kohort (kakor je navedeno v nadaljevanju). Ti organi se nato shranijo pod ustreznimi pogoji. Če ni navedeno drugače, se lahko parni organi stehtajo posamično ali skupaj, v skladu z običajno prakso zadevnega laboratorija.

— Maternica (z jajcevodoma in materničnim vratom), jajčniki.

— Moda, obmodki (v celoti in repi za vzorce za štetje semena).

— Prostata (dorzolateralni in ventralni del skupaj). Pri odstranitvi sklopa prostate je treba paziti, da se ne predreta semenska mešička, ki sta polna tekočine. V primeru učinka na skupno težo prostate, povezanega s tretiranjem, je treba po fiksaciji previdno secirati dorzolateralni in ventralni segment in ju ločeno stehtati.

— Semenska mešička s koagulacijskimi žlezami in njihovimi tekočinami (kot ena enota).

— Možgani, jetra, ledvice, srce, vranica, priželjc, hipofiza, ščitnica (po fiksaciji), nadledvični žlezi in znani tarčni organi ali tkiva.

63. Poleg navedenih organov je treba pod ustreznimi pogoji shraniti vzorce perifernega živca, mišice, hrbtenjače, očesa z vidnim živcem, prebavnega trakta, sečnega mehurja, pljuč, sapnika (s pritrjeno ščitnico in obščitnicami), kostnega mozga, semenovoda (pri samcih), mlečnih žlez (pri samcih in samicah) in nožnice.

64. Pri živalih kohorte 1A se vsi organi stehtajo in shranijo za histopatološke preiskave.

65. Pri preiskavi pred- in poporodno povzročenih imunotoksičnih učinkov se pri 10 samcih in 10 samicah iz kohorte 1A iz vsake tretirane skupine (1 samec ali 1 samica na leglo; iz vsakega legla je naključno izbran vsaj 1 mladič) ob usmrtitvi opravi naslednje:

— tehtanje bezgavk, ki so blizu predela poti izpostavljenosti, in tistih, ki so od njega oddaljene (poleg tehtanja nadledvičnih žlez, priželjca in vranice, ki je bilo pri vseh živalih iz kohorte 1A že opravljeno),

▼M5

— analiza podskupin limfocitov v vranici (limfocitov T s površinskim označevalcem CD4+ in CD8+, limfocitov B in naravnih celic ubijalk) v eni polovici vranice, druga polovica se shrani za histopatološko ovrednotenje.

Z analizo podskupin limfocitov v vranici pri neimuniziranih živalih (kohorta 1A) se bo ugotovilo, ali je izpostavljenost povezana s spremembo imunološke razporeditve celic 'pomagalk' (CD4+), citotoksičnih (CD8+) limfocitov iz priželjca ali naravnih celic ubijalk (hiter odziv na neoplastične celice in patogene).

66. Pri živalih iz kohorte 1B se stehtajo in do vklapljanja v blok obdelajo naslednji organi in tkiva:

— nožnica (nestehtana),

— maternica z maternični vratom,

— jajčniki,

— moda (vsaj eno),

— obmodki,

— semenski mešički in koagulacijske žleze,

— prostata,

— hipofiza,

— opredeljeni tarčni organi.

Histopatološke preiskave pri kohorti 1B se izvedejo, če so rezultati iz kohorte 1A dvoumni, ali v primeru domnevnih strupenih snovi za razmnoževanje ali domnevnih povzročiteljev endokrinih motenj.

67. Kohorti 2A in 2B: Preskušanje razvojne nevrotoksičnosti (21. ali 22. poporodni dan in odrasli potomci). Živali iz kohorte 2A je treba po vedenjskem preskušanju usmrtiti, zabeležiti težo možganov in izvesti popolne nevrohistopatološke preiskave zaradi ocene nevrotoksičnosti. Živali iz kohorte 2B se usmrtijo 21. ali 22. poporodni dan, zabeleži se teža možganov in izvede mikroskopski pregled možganov za oceno nevrotoksičnosti. Fiksiranje s perfuzijo je zahtevano pri živalih iz kohorte 2A in neobvezno pri živalih iz kohorte 2B, kot to določa preskusna metoda B.53 (35).

Teža organov in shranjevanje tkiv – odstavljeni mladiči F_1

68. Mladiči, ki niso izbrani za kohorte, vključno s spački, so po odstavitvi, na 22. poporodni dan, usmrčeni, razen če so na podlagi rezultatov potrebne nadaljnje preiskave živih živali. Na usmrčenih mladičih se izvede makroskopska obdukcija in ocenijo razmnoževalni organi, kakor je opisano v odstavkih 62 in 63. Pri največ 10 mladičih na spol na skupino iz čim več zarodov je treba stehtati možgane, vranico in priželjc ter jih shraniti pod ustreznimi pogoji. Poleg tega se lahko tkiva mlečnih žlez teh mladičev moškega in ženskega spola shranijo za nadaljnjo mikroskopsko analizo ([1]) (glej Smernico OECD št. 151 (40)). Večje nepravilnosti in tarčna tkiva je treba shraniti za morebiten histološki pregled.

([1]) Raziskave so pokazale, da je mlečna žleza, zlasti v zgodnji fazi svojega razvoja, občutljiva končna točka za estrogensko delovanje. Priporoča se, da se pri validaciji v to metodo vključijo končne točke v zvezi z mlečnimi žlezami obeh spolov.

▼M5

Histopatologija – starševske (P) živali

69. Popolni histopatološki pregled iz odstavkov 62 in 63 se opravi za vse starševske (P) živali iz skupin z velikim odmerkom in kontrolnih skupin. Organe, pri katerih so vidne spremembe zaradi tretiranja, je prav tako treba pregledati pri vseh živalih iz skupin z manjšimi odmerki za pomoč pri določanju NOAEL. Poleg tega se histopatološko ovrednotijo razmnoževalni organi vseh živali, za katere se domneva zmanjšana plodnost, npr. pri tistih, ki se niso mogli spariti, spočeti, zaploditi ali skotiti zdravih potomcev, ali pri katerih so bili prizadeti cikličnost pojatev ali število, gibljivost ali morfologija semena, in vse makroskopske poškodbe.

Histopatologija – živali F_1

Živali iz kohorte 1

70. Popolni histopatološki pregled iz odstavkov 62 in 63 se opravi za vse odrasle živali iz skupin z velikim odmerkom in kontrolnih skupin iz kohorte 1A. Iz vsakega legla se uporabi vsaj 1 mladič vsakega spola. Vse makroskopske poškodbe ter organe in tkiva, pri katerih so vidne spremembe zaradi tretiranja, je treba pregledati tudi pri vseh živalih iz skupin z manjšimi odmerki za pomoč pri določanju NOAEL. Za vrednotenje pred- in poporodno povzročenih učinkov na limfoidne organe je treba poleg histopatološkega vrednotenja priželjca, vranice in nadledvičnih žlez, ki se opravi pri vseh živalih iz kohorte 1A, pri 10 samcih in 10 samicah iz kohorte 1A opraviti tudi histopatološko vrednotenje na odvzetih bezgavkah in kostnem mozgu.

71. Pri razmnoževalnih in endokrinih tkivih vseh živali iz kohorte 1B, obdelanih do vklapljanja v blok v skladu z odstavkom 66, je treba v primeru domnevnih strupenih snovi za razmnoževanje ali domnevnih povzročiteljev endokrinih motenj opraviti histopatološke preglede. Živali iz kohorte 1B se histološko pregledajo tudi v primeru, da so rezultati iz kohorte 1A dvoumni.

72. Jajčniki odraslih samic bi morali vsebovati začetne in rastoče folikle, pa tudi rumena telesca; histopatološki pregled bi zato moral biti namenjen količinskemu vrednotenju začetnih in majhnih rastočih foliklov ter rumenih telesc pri samicah F_1; število živali, izbira rezine jajčnika in velikost vzorca rezine morajo biti statistično ustrezni za uporabljeni postopek vrednotenja. Štetje foliklov se lahko najprej izvede na živalih iz kontrolnih skupin in skupin z velikim odmerkom, v primeru škodljivih učinkov pri slednjih pa je treba proučiti tudi nižje odmerke. Pregled mora vključevati štetje števila začetnih foliklov, ki se lahko kombinirajo z majhnimi rastočimi folikli, za primerjavo tretiranih in kontrolnih jajčnikov (glej Smernico OECD št. 151) (40)). Oceno rumenih telesc je treba izvesti vzporedno s preskušanjem cikličnosti pojatev, tako da se lahko faza cikla upošteva pri vrednotenju. Preveriti je treba, ali so se jajcevod, maternica in nožnica ustrezno razvili.

73. Pri samcih F_1 se izvedejo podrobni histopatološki pregledi mod, da bi se ugotovili učinki na diferenciacijo in razvoj mod ter na spermatogenezo, povezani s tretiranjem (38). Če je mogoče, je treba pregledati rezine mrežja mod. Preveriti je treba, ali so se glava, telo in rep obmodkov in semenovod ustrezno razvili, pa tudi parametre za te organe, zahtevane za starševske (P) samce.

▼M5

Živali iz kohorte 2

74. Za vse skupine z velikimi odmerki in kontrolne skupine živali iz kohorte 2A se po končanem preskušanju za nevrološko-vedenjske motnje (po 75. poporodnem dnevu, vendar ne po 90. poporodnem dnevu) opravijo nevrohistopatološki pregledi pri obeh spolih. Histopatološki pregled možganov se pri vseh skupinah z velikimi odmerki in kontrolnih skupinah živali kohorte 2B pri obeh spolih opravi na 21. ali 22. poporodni dan. Organe ali tkiva, pri katerih so vidne spremembe zaradi tretiranja, je prav tako treba pregledati pri vseh živalih iz skupin z manjšimi odmerki za pomoč pri določanju NOAEL. Pri živalih iz kohort 2A in 2B se pregleda več rezin možganov, pri čemer se pregledajo vohalni bulbus, možganska skorja, hipokampus, bazalni gangliji, talamus, hipotalamus, srednji možgani (tectum, tegmentum in možganski pedunkli), možgansko deblo in mali možgani. Samo pri živalih iz kohorte 2A se pregledajo oči (mrežnica in vidni živec) ter vzorci perifernega živca, mišice in hrbtenjače. Vsi nevrohistološki postopki morajo biti v skladu s preskusno metodo B.53 (35).

75. Morfometrična (kvantitativna) vrednotenja je treba opraviti na reprezentativnih območjih možganov (homolognih rezinah, skrbno izbranih na podlagi zanesljivih mikroskopskih znakov) in lahko vključujejo linearne in/ali površinske meritve določenih predelov možganov. Da bi se izbrala najbolj homologna in reprezentativna rezina za določen predel možganov, ki se bo vrednotil, je treba vzeti vsaj tri zaporedne rezine pri vsakem znaku (ravni). Nevropatolog bi moral ustrezno presoditi, ali so rezine, pripravljene za meritev, homologne z drugimi v vzorcu in torej primerne za uporabo, ker se lahko zlasti linearne meritve spreminjajo na relativno kratki razdalji (28). Nehomologne rezine se ne smejo uporabiti. Cilj je vzorčenje vseh živali, ki so za to namenjene (10/spol/velikost odmerka), vendar lahko zadošča tudi manjše število živali. Vzorci, manjši od 6 živali/spol/velikost odmerka, na splošno ne zadoščajo za namene te preskusne metode. S stereologijo se lahko opredelijo s tretiranjem povezani učinki na parametre, kot je količina ali število celic za določene nevroanatomske predele. Vsi vidiki priprave vzorcev tkiva, od fiksacije tkiva do seciranja vzorcev tkiva, obdelave tkiva in barvanja preparatov, bi morali biti načrtovani uravnoteženo, tako da vsaka serija vsebuje reprezentativne vzorce vsake skupine z odmerkom. Pri uporabi morfometrične ali stereološke analize je treba možgansko tkivo vstaviti v ustrezen medij pri vseh velikostih odmerka hkrati, da se ne bi pojavili artefakti zaradi skrčenja, povezani z dolgotrajno hrambo v fiksativu.

POROČANJE

Podatki

76. Podatki se sporočajo posamično in se povzamejo v obliki tabele. Kadar je to mogoče, se za vsako skupino in vsako generacijo sporočijo naslednji podatki: število živali na začetku preskusa, število živali, najdenih poginulih ali usmrčenih iz humanih razlogov med preskusom, čas katere koli smrti ali humane usmrtitve, število plodnih živali, število brejih samic, število samic, ki so skotile zarod, in število živali, ki kažejo znake strupenosti. Sporočiti je treba opis strupenosti, vključno s časom njenega začetka, trajanja in resnosti.

77. Številčni rezultati se morajo oceniti z ustrezno in sprejeto statistično metodo. Statistične metode je treba določiti pri načrtovanju študije; ustrezno morajo obravnavati nenormalne podatke (npr. podatke štetja), okrnjene podatke (npr. omejen čas opazovanja), odvisnost (npr. učinki na zarod in ponovljeni ukrepi) in neenake variance. Posplošeni linearni mešani modeli in modeli odziva na odmerek obsegajo obsežen sklop

▼M5

analitičnih orodij, ki so morda primerni za podatke, pridobljene na podlagi te preskusne metode. Poročilo mora vključevati dovolj informacij o metodi analize in uporabljenem računalniškem programu, tako da lahko neodvisni ocenjevalec/statistik ovrednoti/ponovno ovrednoti analizo.

Vrednotenje rezultatov

78. Ugotovitve je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, vključno z obdukcijo in mikroskopskimi ugotovitvami. Vrednotenje vključuje razmerje ali odsotnost razmerja med odmerkom ter navzočnostjo, pojavom in resnostjo anomalij, vključno z makroskopskimi poškodbami. Oceniti je treba tudi tarčne organe, plodnost, klinične anomalije, zmogljivost razmnoževanja in produkcije zaroda, spremembe telesne teže, učinke na smrtnost ter druge strupene učinke in učinke na razvoj. Posebno pozornost je treba nameniti spremembam, omejenim na en spol. Pri vrednotenju rezultatov je treba upoštevati fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije in, če so na voljo, podatke o toksikokinetiki, vključno s prenosom prek posteljice in izločanjem mleka.

Poročilo o preskusu

79. Poročilo o preskusu naj vsebuje naslednje informacije, pridobljene s to študijo s pomočjo starševskih (P) živali, živali F_1 in živali F_2 (kot je ustrezno):

Preskusna kemikalija:

— vse zadevne razpoložljive informacije o kemikaliji, toksikokinetičnih in toksikodinamičnih lastnostih preskusne kemikalije,

— identifikacijske podatke,

— čistoto.

Nosilec (po potrebi):

— utemeljitev izbire nosilca, če ta ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljeno vrsto/sev,

— število, starost in spol živali,

— izvor, pogoje nastanitve, hrano, material za izdelavo gnezda itd.,

— težo posameznih živali na začetku preskusa,

— podatke o vaginalnem brisu za starševske (P) samice pred pričetkom tretiranja (če so bili podatki takrat zbrani),

— evidenco parjenja starševske (P) generacije z navedbo samca in samice, ki sta se parila, in uspešnost parjenja,

— evidenco o leglu izvora za odrasle živali generacije F_1.

Preskusni pogoji:

— utemeljitev izbire velikosti odmerka,

— podatke o sestavi preskusne kemikalije/pripravi hrane, doseženih koncentracijah,

▼**M5**

— stabilnost in homogenost pripravka v nosilcu (npr. prehrani, pitni vodi), v krvi in/ali mleku pod pogoji uporabe in hrambe med uporabami,

— podrobne podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— pretvorbo koncentracije preskusne kemikalije v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je primerno,

— podrobne podatke o kakovosti hrane in vode (vključno s podatki o sestavi prehrane, če so na voljo),

— podroben opis postopkov randomizacije za izbiro mladičev za izločitev in dodelitev mladičev v preskusne skupine,

— okoljske pogoje,

— seznam osebja, ki je sodelovalo v študiji, vključno s strokovno usposobljenostjo.

Rezultati (povzetek in posamični podatki po spolu in odmerku):

— porabo hrane in porabo vode, če je na voljo, izkoristek hrane (prirast telesne teže na gram zaužite hrane, razen za obdobje sobivanja in med laktacijo) in porabo preskusne kemikalije (za dajanje s hrano/pitno vodo) za starševske (P) živali in živali F_1,

— podatke o absorpciji (če so na voljo),

— podatke o telesni teži za starševske (P) živali,

— podatke o telesni teži za izbrane živali F_1 po odstavitvi,

— čas smrti med študijo oziroma ali podatek o tem, da so živali preživele do zaključka,

— vrsto, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o reverzibilnosti),

— podatke hematoloških preskusov, analize urina in podatke meritev na področju klinične kemije, vključno s TSH in T4,

— fenotipsko analizo vraničnih celic (celic T, B, NK),

— celularnosti kostnega mozga,

— podatke o odzivu na strupenost,

— število starševskih (P) samic in samic F_1 z normalnim ali nenormalnim pojatvenim ciklom in trajanje cikla,

— čas do parjenja (predkoitalni interval, število dni med parjenjem in oploditvijo),

— strupene ali druge učinke na razmnoževanje, vključno s številom in odstotkom živali, ki so se sparile, bile breje, so skotile in dosegle laktacijo, odstotkom samcev, ki so oplodili samico, in samic z znaki distocije/podaljšano ali zahtevno kotitvijo,

— trajanje brejosti in, če so podatki na voljo, kotitve,

— število vgnezditev, velikost zaroda in odstotek mladičev moškega spola,

— število in odstotek izgub po vgnezditvi, živorojenih in mrtvorojenih živali,

▼M5

— podatke o teži zaroda in posameznih mladičev (samcev, samic in obeh spolov), število spačkov, če je ugotovljeno,

— število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami,

— strupene ali druge učinke na potomce, poporodno rast, sposobnost preživetja itd.,

— podatke o fizičnih znakih pri mladičih in druge podatke o poporodnem razvoju,

— podatke o spolnem zorenju živali F_1,

— podatke o opazovanju funkcij pri mladičih in odraslih, kot je primerno,

— telesno težo ob usmrtitvi in podatke o absolutni in relativni teži organov za starševske (P) živali in odrasle živali F_1,

— ugotovitve obdukcije,

— natančen opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— skupno število semena v repu obmodka, odstotek progresivno gibljivega semena, odstotek morfološko normalnega semena in odstotek semena z ugotovljeno posamezno anomalijo za starševske (P) samce in odrasle samce F_1,

— število in faze zrelosti foliklov v jajčnikih starševskih (P) samic in samic F_1, če je primerno,

— število rumenih telesc v jajčnikih samic F_1,

— statistično obdelavo rezultatov, če je to primerno.

Parametri kohorte 2:

— podroben opis postopkov za standardiziranje opažanj in postopkov ter operativne opredelitve za ocenjevanje opažanj,

— seznam vseh uporabljenih preskusnih postopkov in utemeljitev njihove uporabe,

— podrobnosti o uporabljenih vedenjskih/funkcionalnih, nevropatoloških in morfometričnih postopkih, vključno z informacijami in podrobnostmi o avtomatiziranih napravah,

— postopke za umerjanje in zagotavljanje enakovrednosti naprav ter uravnoteženje tretiranih skupin v preskusnih postopkih,

— kratko utemeljitev, s katero se pojasnijo odločitve na podlagi strokovne presoje,

— podrobnosti o vseh vedenjskih/funkcionalnih, nevropatoloških in morfometričnih ugotovitvah po spolu in skupini z odmerkom, vključno s povečanji in zmanjšanji iz kontrolnih skupin,

— težo možganov,

— morebitne diagnoze na podlagi nevroloških znakov in poškodb, vključno z naravnimi pojavi bolezni ali stanj,

— slike vzorčnih ugotovitev,

— slike majhne povečave za ocenjevanje homologije rezin, uporabljenih za morfologijo,

▼M5

— statistično obdelavo rezultatov, vključno s statističnimi modeli, uporabljenimi za analizo podatkov, in rezultate, ne glede na to, ali so bili značilni ali ne,

— odnos katerih koli drugih strupenih učinkov do sklepne ugotovitve o nevrotoksičnem potencialu preskusne kemikalije, po spolu in skupini z odmerkom,

— vpliv katerih koli informacij o toksikokinetiki na sklepne ugotovitve,

— podatke, ki podpirajo zanesljivost in občutljivost preskusne metode (tj. podatke o pozitivni kontroli in pretekle kontrolne podatke),

— odnose, če obstajajo, med nevropatološkimi in funkcionalnimi učinki,

— NOAEL ali primerjalni odmerek za matere in potomce, po spolu in skupini z odmerkom,

— razpravo o celotni razlagi podatkov na podlagi rezultatov, vključno s sklepno ugotovitvijo o tem, ali je kemikalija povzročila razvojno nevrotoksičnost, in NOAEL.

Parametri kohorte 3:

— titre serumskih protiteles IgM (senzibilizacija na SRBC ali KHL) ali vraničnih enot IgM PFC (senzibilizacija na SRBC),

— izvajanje metode TDAR morajo v okviru procesa optimizacije potrditi laboratorij, ki prvič izvaja preskus, in redno (npr. letno) vsi laboratoriji,

— razpravo o celotni razlagi podatkov na podlagi rezultatov, vključno s sklepno ugotovitvijo o tem, ali je kemikalija povzročila razvojno imunotoksičnost, in NOAEL.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve, tudi vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov pri starših in potomcih

Zagotoviti je treba tudi vse informacije, ki niso bile pridobljene med študijo, ampak so uporabne za razlago rezultatov (npr. podobnost učinkov z učinki znanih nevrotoksinov).

Razlaga rezultatov

80. Razširjena enogeneracijska študija strupenosti za razmnoževanje po potrebi zagotavlja informacije o učinkih ponovne izpostavljenosti kemikaliji med vsemi fazami reprodukcijskega cikla. Študija zlasti zagotavlja informacije o razmnoževalnem sistemu ter o končnih točkah razvoja, rasti, preživetja in delovanja potomcev do 90. poporodnega dne.

81. Pri razlagi rezultatov je treba upoštevati vse razpoložljive informacije o kemikaliji, vključno s fizikalno-kemijskimi, toksikokinetičnimi in toksikodinamičnimi lastnostmi, razpoložljive zadevne informacije o strukturnih analogih in rezultate iz predhodno izvedenih študij strupenosti s preskusno kemikalijo (npr. akutno strupenost, strupenost po ponovnih aplikacijah, mehanistične študije ter študije za ocenjevanje znatnih kvalitativnih in kvantitativnih razlik med vrstami med presnovnimi lastnostmi *in vivo*/*in vitro*). Rezultate makroskopske obdukcije in tehtanja organov je treba oceniti v smislu ugotovitev iz drugih študij s ponavljajočimi se odmerki, kadar je to izvedljivo. Zmanjšano rast potomcev je mogoče obravnavati v zvezi z učinkom preskusne kemikalije na sestavo mleka (29).

▼M5

Kohorta 2 (razvojna nevrotoksičnost)

82. Rezultate nevrovedenjske in nevropatološke analize je treba razlagati v okviru vseh ugotovitev z analizo, ki temelji na tehtnosti dokazov, in strokovno presojo. Potrebna je razprava o vzorcih vedenjskih ali morfoloških ugotovitev, če so prisotni, in dokazih odziva na odmerek. V to opredelitev je treba vključiti vrednotenje razvojne nevrotoksičnosti, vključno z epidemiološkimi študijami na ljudeh ali poročili o primerih, in eksperimentalne študije na živalih (npr. podatki o toksikokinetiki, informacije o razmerju med strukturo in aktivnostjo, podatki iz drugih študij strupenosti). V vrednotenje podatkov je treba vključiti razpravo o biološki in statistični značilnosti. Vrednotenje naj vključuje odnos med ugotovljenimi nevropatološkimi in vedenjskimi spremembami, če obstaja. Za navodila o razlagi rezultatov o razvojni nevrotoksičnosti glej preskusno metodo B.53 (35) in Tyl et al., 2008 (31).

Kohorta 3 (razvojna imunotoksičnost)

83. V okviru vseh ugotovitev je treba ovrednotiti zaviranje ali krepitev imunskega sistema, kakor je ocenjena s TDAR (protitelesni odziv na osnovi T-celic). Pomembnost rezultata odziva protiteles, odvisnega od celic T, lahko podprejo drugi učinki na imunološko povezane kazalnike (npr. celularnost kostnega mozga, teža in histopatološke preiskave limfoidnih tkiv, razporeditev podskupin limfocitov). Učinki, ugotovljeni na podlagi odziva protiteles, odvisnega od celic T, morda ne bodo tako pomembni v primeru drugih ugotovljenih strupenosti pri nizkih koncentracijah izpostavljenosti.

84. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in nevrotoksičnosti glej Smernico OECD št. 43 (26).

VIRI

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼**M5**

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383–390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida, str. 319–333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

(30) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717–1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.

(32) OECD (1996), Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) Poglavje B.43 te priloge, Študija nevrotoksičnosti na glodalcih.

(34) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Poglavje B.53 te priloge, Študija razvojne nevrotoksičnosti.

(36) Poglavje B.54 te priloge, Uterotropni biološki preskus na glodavcih: kratkotrajni presejalni preskus za estrogene lastnosti.

(37) Poglavje B.55 te priloge, Hershbergerjev biološki preskus na podganah: kratkotrajni presejalni preskus za (anti)androgene lastnosti.

▼**M5**

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Dodatek 1

Meritve in opazovanja, vključena v sklop funkcionalnih opazovanj (kohorta 2A)

Domača kletka in na terenu	Gibalne	Fiziološke
Drža	Enostaven prenos	Temperatura
Neprostovoljni klonični in tonični	Enostavno ravnanje	Telesna teža
Zaprtost očesne veke	Tonus mišic	Odziv zenic
Piloerekcija	Odziv na pristop	Velikost zenic
Slinjenje	Odziv na dotik	
Solzenje	Odziv na slušni dražljaj	
Oddajanje glasov	Odziv na stiskanje repa	
Dvigovanje	Posturalni odziv	
Anomalije pri hoji	Razširjenost prstov pri pristanku	
Vzburjenost	Moč oprijema s prednjimi okončinami	
Stereotipije	Moč oprijema z zadnjimi okončinami	
Nenormalno vedenje		
Madeži		
Anomalije pri dihanju		

▼**M5**

Dodatek 2

OPREDELITVE:

Kemikalija: snov ali zmes.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, ki se preskuša s to preskusno metodo.

▼M5

B.57 **PRESKUS STEROIDOGENEZE CELIC H295R**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) št. 456 (2011). OECD je leta 1998 začela z izvajanjem prednostne dejavnosti, da bi pregledala obstoječe in razvila nove smernice za odkrivanje in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Temeljni okvir OECD iz leta 2002 za preskušanje in oceno povzročiteljev endokrinih motenj (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals), zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza posamezni stopnji biološke kompleksnosti (1). Za preskus steroidogeneze celic H295R *in vitro* (H295R), opisan v okviru te preskusne metode, se uporablja adenokarcinomska celična linija človeka (celice NCI-H295R), pri čemer preskus predstavlja raven 2 'preskusa *in vitro* za zagotavljanje mehanističnih podatkov', ki se uporablja za namene presejanja in prednostnega razvrščanja. Priprava in standardizacija preskusa kot presejalnega preskusa za odkrivanje kemičnih učinkov na steroidogenezo, zlasti proizvajanje 17β-estradiola (E2) in testosterona (T), sta bili izvedeni v postopku, ki ga sestavlja več korakov. Preskus celic H295R je bil optimiziran in validiran (2) (3) (4) (5).

2. Cilj preskusa steroidogeneze celic H295R je zaznati kemikalije, ki vplivajo na proizvajanje E2 in T. Namen preskusa celic H295R je identificirati ksenobiotike, katerih ciljna območja so endogene komponente, ki zajemajo znotrajcelične biokemijske poti, ki se začnejo z zaporedjem reakcij od holesterola do proizvajanja E2 in/ali T. Preskus celic H295R ni namenjen identifikaciji kemikalij, ki vplivajo na steroidogenezo zaradi učinkov na os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze (HPG). Cilj preskusa je zagotoviti odgovor DA/NE na vprašanje o možnosti, da bi kemikalija povzročila ali zavirala proizvodnjo T in E2, vendar je mogoče v nekaterih primerih dobiti tudi kvantitativne rezultate (glej odstavka 53 in 54). Rezultati preskusa so izraženi kot relativne spremembe v proizvodnji hormonov v primerjavi s kontrolnimi vzorci s topilom (KVT). Namen preskusa ni zagotoviti posebnih mehanističnih informacij glede interakcije preskusne kemikalije z endokrinim sistemom. V raziskavi je bila uporabljena celična linija za opredelitev učinkov na posebne encime in vmesne hormone, kot je progesteron (2).

3. Opredelitve in kratice, uporabljene v okviru te preskusne metode, so opisane v Dodatku. Podroben protokol, vključno z navodili za pripravo raztopin, gojenje celic in izvajanje različnih vidikov preskusa, je na voljo v dodatkih I–III k dokumentu OECD 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4).

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

4. V biosintezo spolnih steroidnih hormonov je vključenih pet različnih encimov, ki katalizirajo šest različnih reakcij. Encimska pretvorba holesterola v pregnenolon z encimom za cepitev stranske verige holesterola (CYP11A) iz družine citokromov P450 (CYP) predstavlja prvi korak v zaporedju biokemijskih reakcij, ki se končajo s sintezo steroidnih končnih proizvodov. Glede na vrstni red naslednjih dveh reakcij se steroidogenska pot razdeli na dve poti, in sicer Δ^5-hidroksisteroidno pot in Δ^4-ketosteroidno pot, ki se končata s proizvodnjo androstendiona (slika 1).

5. Androstendion se pretvori v testosteron (T) s pomočjo 17β-hidroksisteroidne dehidrogenaze (17β-HSD). Testosteron je tako vmesni kot končni hormonski produkt. Pri moškem se lahko T pretvori v dihidrotestosteron (DHT) s 5α-reduktazo, ki se nahaja v celičnih membranah, jedrni ovojnici in endoplazmatskem retikulumu tarčnih tkiv androgenega delovanja, kot so prostata in semenski mešički. DHT je kot androgen znatno močnejši kot T in se prav tako šteje za končni hormon. Pri preskusu celic H295R se DHT ne meri (glej odstavek 10).

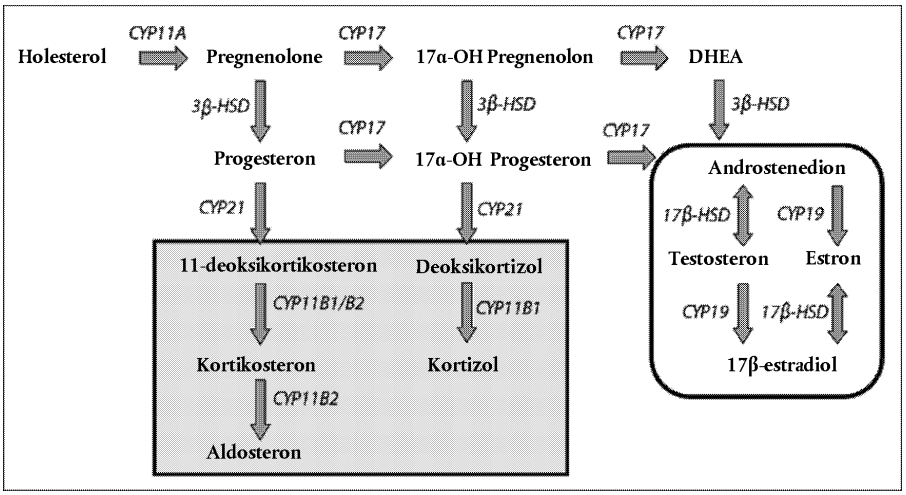
▼M5

6. Encim na steroidogenski poti, ki pretvori androgene kemikalije v estrogene kemikalije, je aromataza (CYP19). CYP19 pretvori T v 17β-estradiol (E2) in androstendion v estron. E2 in T se štejeta za končna hormona steroidogenske poti.

7. Specifičnost aktivnosti liaze CYP17 se med vrstami razlikuje pri vmesnih substratih. Pri človeku daje encim prednost substratom Δ^5-hidroksisteroidne poti (pregnenolon), pri podgani pa imajo prednost substrati Δ^4-ketosteroidne poti (progesteron) (19). S takšno razliko aktivnosti liaze CYP17 se lahko razložijo nekatere razlike v odzivu na kemikalije, ki spreminjajo steroidogenezo *in vivo* in so odvisne od vrst (6). Dokazano je, da celice H295 najbolj točno odražajo izražanje adrenalnih encimov in vzorec proizvajanja steroidov pri odraslem človeku (20), vendar je znano, da izražajo encime tako za Δ^5-hidroksisteroidne kot tudi za Δ^4-ketosteroidne poti za sintezo androgenov (7) (11) (13) (15).

Slika 1

Steroidogenska pot v celicah H295R



Opomba:

Encimi so v ležečem tisku, hormoni so v odebeljenem tisku, puščice pa označujejo smer sinteze. Sivo ozadje označuje kortikosteroidne poti/produkte. Poti spolnih steroidov/produktov so obkroženi. CYP = citokrom P450; HSD = hidroksisteroidna dehidrogenaza; DHEA = dehidroepiandrosteron.

8. Človeška adenokarcinomska celična linija H295R je uporaben model *in vitro* za preiskovanje učinkov na sintezo steroidnih hormonov (2) (7) (8) (9) (10). V celični liniji H295R se izražajo geni, ki kodirajo vse ključne encime za zgoraj navedeno steroidogenezo (11) (15) (slika 1). To je edinstvena lastnost, ker je izražanje teh genov *in vivo* specifično za tkiva in razvojno fazo, pri čemer se običajno v enem tkivu ali eni razvojni fazi ne izražajo vsi geni, ki sodelujejo pri steroidogenezi (2). Celice H295R imajo fiziološke značilnosti consko nediferenciranih človeških fetalnih celic nadledvičnice (11). Celice predstavljajo edinstven sistem *in vitro*, ker so sposobne proizvesti vse steroidne hormone, ki se nahajajo v skorji nadledvične žleze in spolnih žlezah, kar omogoča preskušanje učinkov na sintezo kortikosteroidov in proizvajanje spolnih steroidnih hormonov, kot so androgeni in estrogeni, čeprav je bil preskus validiran le za zaznavanje T in E2. Spremembe, ki jih preskusni sistem zabeleži v obliki spremembe proizvodnje T in E2, so lahko rezultat številnih različnih interakcij preskusnih kemikalij s steroidogenimi funkcijami, ki se izražajo s celicami H295R.

▼**M5**

Vključujejo modulacijo izražanja, sintezo ali funkcijo encimov, ki sodelujejo pri proizvajanju, pretvorbi ali odstranitvi steroidnih hormonov (12) (13) (14). Zaviranje proizvajanja hormonov je lahko posledica neposredne konkurenčne vezave z encimom na poti, vpliva na kofaktorje, kot sta NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) in cAMP (ciklični adenozin monofosfat), in/ali povečanja steroidne presnove ali supresije izražanja genov nekaterih encimov na poti steroidogeneze. Medtem ko je lahko zaviranje funkcija neposrednih ali posrednih postopkov pri proizvajanju hormonov, je indukcija običajno posredna, na primer z vplivanjem na kofaktorja, kot sta NADPH in cAMP (kot v primeru forskolina), zmanjšanjem steroidne presnove (13) in/ali povečanjem izražanja genov za sintezo steroidov.

9. Preskus celic H295R ima več prednosti:

— omogoča zaznavanje tako povečanja kot tudi zmanjšanja proizvajanja T in E2,

— omogoča neposredno oceno možnih učinkov kemikalije na sposobnost preživetja celic/citotoksičnost. To je pomembna lastnost, saj omogoča razlikovanje med učinki, ki so posledica citotoksičnosti, in učinki, ki so posledica neposredne interakcije kemikalij s steroidogenimi potmi, kar pri sistemih izsečkov tkiv, ki zajemajo več vrst celic različnih občutljivosti in funkcionalnosti, ni mogoče,

— ne zahteva se uporaba živali,

— celična linija H295R je na voljo na tržišču.

10. Glavne omejitve preskusa so naslednje:

— njegova presnovna zmogljivost ni znana, vendar je verjetno zelo omejena, zato bodo kemikalije, ki morajo biti presnovno aktivirane, v tem preskusu verjetno spregledane,

— ker celice H295R izhajajo iz tkiva nadledvične žleze, vsebujejo encime, ki so sposobni proizvodnje glukokortikoidov in mineralokortikoidov ter spolnih hormonov, zato bi lahko učinki na proizvajanje glukokortikoidov in mineralokortikoidov vplivali na ravni T in E2, opažene v preskusu,

— ker se v njem ne meri DHT, se ne pričakuje zaznavanje kemikalij, ki zavirajo 5α-reduktazo, pri čemer se lahko v tem primeru uporabi Hershbergerjev preskus (16),

— preskus celic H295R ne bo zaznal kemikalij, ki vplivajo na steroidogenezo prek vpliva na os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze (HPG), ker se to lahko proučuje le pri nepoškodovanih živalih.

NAČELO PRESKUSA

11. Cilj tega preskusa je zaznavanje kemikalij, ki vplivajo na proizvajanje E2 in T. T je tudi posrednik na poti proizvajanja E2. V preskusu se lahko zaznajo kemikalije, ki običajno zavirajo ali sprožijo encime poti steroidogeneze.

▼M5

12. Preskus se običajno opravi pod standardnimi pogoji za celične kulture na plošči s 24 jamicami za gojenje kulture. Za izvajanje preskusa se lahko uporabijo tudi plošče drugih velikosti, vendar je treba nasaditvene in preskusne pogoje ustrezno prilagoditi, da se ohrani upoštevanje meril uspešnosti.

13. Po 24-urni aklimatizaciji na ploščah z več jamicami so celice 48 ur izpostavljene sedmim koncentracijam preskusne kemikalije v vsaj treh ponovitvah. Topilo ter znan zaviralec in povzročitelj proizvajanja hormonov se v nespremenljivi koncentraciji preskusita kot negativni in pozitivni kontrolni vzorec. Ob koncu obdobja izpostavljenosti se iz vseh jamic odstrani gojišče. Sposobnost preživetja celic v posamezni jamici se analizira takoj po odstranitvi gojišča. Koncentracije hormonov v gojišču se lahko izmerijo z uporabo različnih metod, vključno s kompleti za hormonske meritve, ki so na voljo na tržišču, in/ali instrumentalnimi tehnikami, kot je tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC-MS). Podatki so izraženi kot razmerje spremembe glede na kontrolni vzorec s topilom in najnižjo koncentracijo z opaženim učinkom (LOEC). Če je preskus negativen, se največja preskušena koncentracija sporoči kot koncentracija brez opaznega učinka (NOEC). Sklepne ugotovitve glede sposobnosti kemikalije, da vpliva na steroidogenezo, morajo temeljiti na vsaj dveh neodvisnih ponovitvah preskusa. Prvi potek preskusa lahko deluje kot ponovitev za ugotavljanje območja, pri čemer se koncentracije za drugo ali tretjo ponovitev po potrebi naknadno prilagodijo, če nastanejo težave v zvezi s topnostjo ali citotoksičnostjo ali če se zdi, da je kemikalija aktivna na robu območja preskušane koncentracije.

POSTOPEK V ZVEZI S KULTURAMI

Celična linija

14. Celice NCI-H295R na tržišču zagotavlja American Type Culture Collections (ATCC) po podpisu sporazuma o prenosu materiala ([1]).

Uvod

15. Zaradi sprememb zmogljivosti celic za proizvajanje E2 s staranjem/večanjem pasaž (2) je treba celice pred uporabo gojiti v skladu s posebnim protokolom, pri čemer je treba zabeležiti število pasaž od odtajanja celic ter število pasaž, pri katerem so bile celice zamrznjene in shranjene v tekoči dušik. Prvo število označuje dejansko število pasaž celic, drugo število pa število pasaž, pri katerem so bile celice zamrznjene in shranjene. Celice, ki so bile zamrznjene po peti pasaži in odtajane ter so se nato trikrat delile (4 pasaže, pri čemer se sveže odtajane celice štejejo kot pasaža 1) po ponovnem gojenju, bi bile na primer označene s pasažo 4,5. Primer označevanja s številkami je naveden v Dodatku 1 k validacijskemu poročilu (4).

16. Založno gojišče se uporablja kot osnova za obogatena gojišča ali gojišča za zamrzovanje. Obogateno gojišče je potreben sestavni del gojenja celic. Gojišče za zamrzovanje je posebej zasnovano tako, da omogoča zamrzovanje celic za dolgoročno shranjevanje brez posledic. V Nu-serumu (ali primerljivem serumu z enakimi lastnostmi, ki dokazano zagotavlja podatke, ki izpolnjujejo zahteve glede izvedbe preskusa in kontrole kakovosti), ki je sestavina obogatenega gojišča, je treba analizirati za osnovne koncentracije T in E2. Priprava teh raztopin je opisana v Dodatku II k validacijskemu poročilu (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, ZDA [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Po iniciaciji celične kulture H295R iz izvirne serije ATCC morajo celice rasti pet pasaž (tj. se celice delijo štirikrat). Celice pete pasaže se nato zamrznejo v tekočem dušiku za shranjevanje. Pred zamrzovanjem celic se vzorec prejšnjih celic četrte pasaže preskusi na plošči za kontrolo kakovosti (glej odstavka 36 in 37), da se preveri, ali osnovno proizvajanje hormonov in odziv na pozitivne kontrolne kemikalije izpolnjujeta merila za kontrolo kakovosti preskusa iz tabele 5.

18. Celice H295R je treba gojiti, zamrzniti in shraniti v tekočem dušiku, da se zagotovi stalna razpoložljivost celic ustrezne pasaže/starosti za gojenje in uporabo. Največje število pasaž po dodajanju nove ([1]) ali zamrznjene ([2]) serije celic v kulturo, ki je sprejemljiva za uporabo v preskusu celic H295R, ne sme biti večje od 10. Sprejemljive pasaže za kulture celic iz serije, ki je bila zamrznjena pri pasaži 5, so na primer med 4,5 in 10,5. Za celice, ki se gojijo iz teh zamrznjenih serij, je treba upoštevati postopek iz odstavka 19. Te celice je treba gojiti vsaj štiri (4) dodatne pasaže (pasaža 4,5), preden se uporabijo pri preskušanju.

Začetne celice iz zamrznjene zaloge

19. Postopek za začetek gojenja celic iz zamrznjene zaloge je treba uporabiti, če se nova serija celic odstrani iz hrambe v tekočem dušiku za namen gojenja in preskušanja. Podrobnosti o tem postopku so navedene v Dodatku III k validacijskemu poročilu (4). Celice se odstranijo iz hrambe v tekočem dušiku, hitro odtajajo, vstavijo v obogateno gojišče v centrifugirki, centrifugirajo pri sobni temperaturi, ponovno suspendirajo v obogatenem gojišču in prestavijo v bučke. Gojišče je treba naslednji dan zamenjati. Celice H295R se gojijo v inkubatorju pri 37 °C s 5 % CO_2 v atmosferi z zrakom, pri čemer se gojišče obnovi dvakrat do trikrat na teden. Ko so celice približno 85–90-odstotno konfluentne, jih je treba deliti. Delitev celic je potrebna, da se zagotovijo zdrave celice, ki rastejo in se ohranijo za opravljanje bioloških preskusov. Celice se trikrat sperejo s fosfatnim pufrom s soljo (PBS, brez Ca^{2+} Mg^{2+}) in odstranijo iz bučk z dodajanjem ustreznega encima za ločevanje, npr. tripsina, v PBS (brez Ca^{2+} Mg^{2+}). Takoj ko se celice ločijo od bučke, je treba delovanje encima ustaviti z dodajanjem obogatenega gojišča v razmerju trikratnika volumna, uporabljenega za tretiranje z encimom. Celice se prestavijo v centrifugirko, centrifugirajo pri sobni temperaturi, supernatant se odstrani, peleti celic pa se ponovno suspendirajo v obogatenem gojišču. Ustrezna količina raztopine s celicami se da v novo bučko. Količino raztopine s celicami je treba prilagoditi tako, da so celice konfluentne v 5–7 dneh. Priporočeno razmerje subkultivacije je od 1:3 do 1:4. Ploščo je treba skrbno označiti. Celice so zdaj pripravljene za uporabo v preskusu, odvečne celice pa je treba zamrzniti v tekočem dušiku, kot je opisano v odstavku 20.

([1]) „Nova serija“ pomeni svežo serijo celic, prejetih od dobavitelja ATCC.

([2]) „Zamrznjena serija“ pomeni celice, ki so že bile gojene in nato zamrznjene v laboratoriju, ki ni laboratorij dobavitelja ATCC.

▼M5

Zamrzovanje celic H295R (priprava celic za shranjevanje v tekočem dušiku)

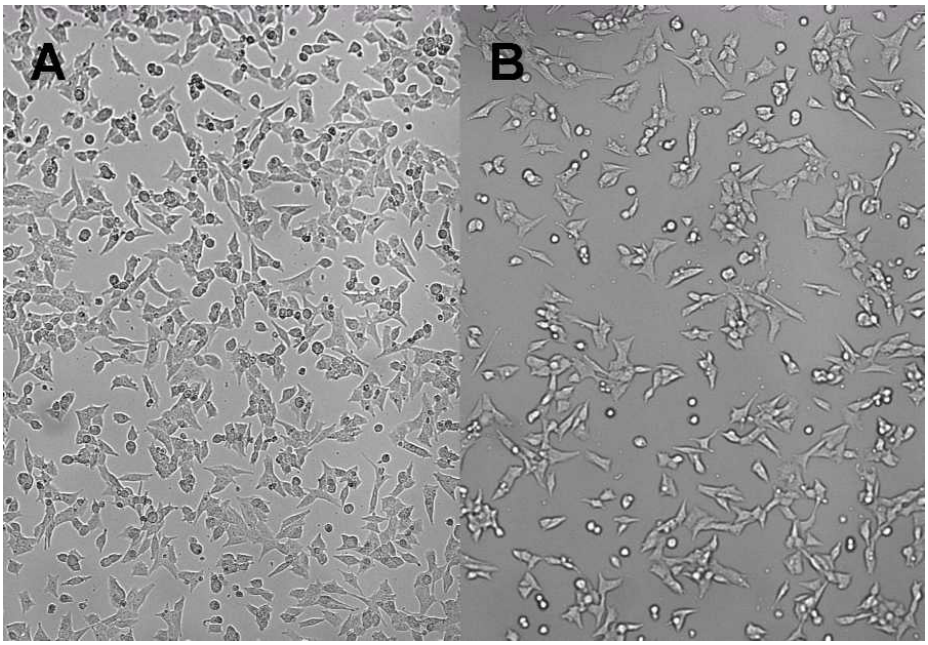
20. Pri pripravi celic H295R za zamrzovanje je treba upoštevati zgoraj opisani postopek delitve celic do faze ponovnega suspendiranja peletov celic na dnu centrifugirke. V tem primeru se peleti celic ponovno suspendirajo v gojišču za zamrzovanje. Raztopina se prenese v ustrezno označeno kriovialo, ki se zamrzne pri – 80 °C za 24 ur in se nato prestavi v tekoči dušik za shranjevanje. Podrobnosti o tem postopku so navedene v Dodatku III k validacijskemu poročilu (4).

Nasaditev in predhodna inkubacija celic za preskušanje

21. Število plošč s 24 jamicami, pripravljenih, kot je opisano v odstavku 19, ki bo potrebno, je odvisno od števila kemikalij, ki jih je treba preskusiti, in konfluentnosti celic v posodah za gojenje. Ena bučka (75 cm^2) s celicami, ki so 80–90-odstotno konfluentne, bo na splošno zagotovila dovolj celic za 1–1,5 plošče (s 24 jamicami) s ciljno gostoto od 200 000 do 300 000 celic na mililiter gojišča, zaradi česar bo konfluentnost v jamicah po 24 urah 50–60-odstotna (slika 2). To je tipična optimalna gostota celic za proizvajanje hormonov v preskusu. Pri večjih gostotah se vzorci proizvajanja T in E2 spremenijo. Priporočljivo je, da se pred prvim izvajanjem preskusa preskusijo različne gostote zasejanja med 200 000 in 300 000 celicami na ml, za nadaljnje preskuse pa izbere gostota, ki po 24 urah povzroči 50–60-odstotno konfluentnost v jamicah.

Slika 2

Mikrofotografija celic H295R pri gostoti zasejanja 50 % v plošči s 24 jamicami za gojenje kulture po 24 urah, posneta na robu jamice (A) in sredi jamice (B)



22. Gojišče se s pipeto nakapa iz bučke, celice pa se trikrat sperejo s sterilnim PBS (brez Ca^{2+} Mg^{2+}). Za ločitev celic od bučke se doda raztopina z encimi (v PBS). Po ustrezno dolgem ločevanju celic je treba delovanje encima ustaviti z dodajanjem obogatenega gojišča v razmerju trikratnika volumna, uporabljenega za tretiranje z encimom. Celice se prestavijo v centrifugirko, centrifugirajo pri sobni temperaturi, supernatant se odstrani, peleti celic pa se ponovno suspendirajo v obogatenem gojišču. Gostota celic se izračuna na

▼M5

primer s hemocitometrom ali števcem celic. Raztopino s celicami je treba razredčiti do želene gostote za nasaditev in skrbno premešati, da se zagotovi homogena gostota celic. Celice je treba nasaditi z 1 ml raztopine s celicami na jamico, plošče in jamice pa označiti. Zasejane plošče se 24 ur inkubirajo pri 37 °C in 5 % CO_2 v atmosferi z zrakom, da se omogoči pritrditev celic na jamice.

ZAHTEVE GLEDE KONTROLE KAKOVOSTI

23. Ključno je, da se med odmerjanjem v jamice dajo natančne količine raztopin in vzorcev, ker te količine določajo koncentracije, uporabljene v izračunih rezultatov preskusov.

24. Pred iniciacijo celične kulture in nadaljnjimi preskušanji mora vsak laboratorij dokazati občutljivost svojega sistema za merjenje hormonov (odstavki 29–31).

25. Če je treba uporabiti preskuse meritev hormonov na podlagi protiteles, je treba pred začetkom preskušanja analizirati možen vpliv kemikalij, ki se bodo preskušale, na sistem za merjenje, ki se uporablja za količinsko opredelitev T in E2, kot je opisano v odstavku 32.

26. Priporočeno topilo za preskus je DMSO. Če se uporabi drugo topilo, je treba določiti naslednje:

— topnost preskusne kemikalije, forskolina in prokloraza v topilu ter

— citotoksičnost kot funkcijo koncentracije topila.

Priporoča se, da največja dovoljena koncentracija topila ne presega desetkratnika razredčine najmanj citotoksične koncentracije topila.

27. Pred prvim izvajanjem preskušanja mora laboratorij opraviti zahtevani preskus, kot je opisan v odstavkih 33–35, s katerim dokaže, da je sposoben ohraniti in doseči ustrezno celično kulturo ter preskusne pogoje, ki so potrebni za preskušanja kemikalij.

28. Ob začetku preskušanja z novo serijo je treba pred uporabo nove serije celic opraviti preskus s kontrolno ploščo, da se ovrednoti delovanje celic, kot je opisano v odstavkih 36 in 37.

Učinkovitost sistema za merjenje hormonov

Občutljivost metode, točnost, natančnost in navzkrižna reaktivnost z matriko vzorčenja

29. Vsak laboratorij lahko za analizo proizvajanja T in E2 v celicah H295R uporabi sistem za merjenje hormonov po svoji izbiri, pod pogojem, da izpolnjuje merila uspešnosti, vključno z mejo določljivosti. Meji sta običajno 100 pg/ml za T in 10 pg/ml za E2 ter temeljita na osnovnih ravneh hormonov, opaženih v validacijskih študijah. Vendar so lahko glede na osnovne ravni hormonov, dosežene v zadevnem laboratoriju, ustrezne višje ali nižje ravni. Pred začetkom plošče za kontrolo kakovosti in potekov preskusov mora laboratorij dokazati, da je s preskusom hormonov, ki se bo uporabil, koncentracije hormonov v obogatenem gojišču mogoče izmeriti z ustrezno točnostjo in natančnostjo, da so izpolnjena merila za kontrolo kakovosti iz tabel 1 in 5, in sicer z analizo obogatenega gojišča s primešanim hormonom kot interno kontrolo. Obogatenemu gojišču se dodajo vsaj tri koncentracije vsakega hormona (npr. 100, 500 in 2 500 pg/ml T, 10, 50 in 250 pg/ml E2 ali pa se lahko za najmanjše primešane koncentracije za T in E2 uporabijo in analizirajo najmanjše možne koncentracije na podlagi

▼M5

mej zaznavnosti za izbrani sistem za merjene hormonov). Izmerjene koncentracije hormonov neekstrahiranih vzorcev morajo biti znotraj 30 % nominalnih koncentracij, razlika med ponovnimi meritvami istega vzorca pa ne sme presegati 25 % (glej tudi tabelo 8 za dodatna merila kontrole kakovosti). Če so ta merila kontrole kakovosti izpolnjena, se šteje, da je izbrani preskus meritve hormonov dovolj točen in natančen ter ne reagira navzkrižno s sestavinami v gojišču (matrika vzorca) tako, da bi se lahko pričakoval znaten vpliv na rezultat preskusa. V tem primeru ekstrakcija vzorcev pred merjenjem hormonov ni potrebna.

30. Če merila kakovosti iz tabel 1 in 8 niso izpolnjena, lahko pride do znatnih vplivov matrike in je treba izvesti preskus z ekstrahiranim primešanim gojiščem. Primer postopka ekstrakcije je opisan v Dodatku II k validacijskemu poročilu (4). Meritve koncentracij hormonov v ekstrahiranih vzorcih je treba trikrat ponoviti ([1]). Če je mogoče dokazati, da sestavine gojišča po ekstrakciji ne vplivajo na metodo zaznavanja hormonov, kot je opredeljeno z merili kontrole kakovosti, je treba vse nadaljnje preskuse izvesti z uporabo ekstrahiranih vzorcev. Če po ekstrakciji meril kontrole kakovosti ni mogoče izpolniti, uporabljeni sistem za merjenje hormonov ni primeren za namen preskusa steroidogeneze celic H295R in je treba uporabiti drugo metodo za zaznavanje hormonov.

Umeritvena krivulja

31. Koncentracije hormonov v kontrolnih vzorcih s topilom (KVT) morajo biti znotraj linearnega dela umeritvene krivulje. Najbolje je, da so vrednosti kontrolnih vzorcev s topilom blizu sredine linearnega dela, da se omogoči merjenje povzročanja in zaviranja sinteze hormonov. Ustrezno se izberejo razredčine gojišča (ali ekstraktov), ki jih je treba izmeriti. Linearno povezavo je treba določiti z ustreznim statističnim pristopom.

Preskus vpliva kemikalij

32. Če se bodo za merjenje hormonov uporabljali preskusi na podlagi protiteles, kot so encimskoimunski preskusi (ELISA) in radioimunski preskusi (RIA), je treba za vsako kemikalijo preskusiti možen vpliv na sistem za merjenje hormonov, ki se bo uporabil, preden se začne dejansko preskušanje kemikalij (Dodatek III k validacijskemu poročilu (4)), ker lahko nekatere kemikalije vplivajo na te preskuse (17). Če se z analizo hormonov ugotovi prisotnost vpliva, ki je enak ali večji od 20 % osnovne proizvodnje hormonov T in/ali E2, je treba opraviti preskus vpliva kemikalij na preskus

([1]) *Opomba:* Če je potrebna ekstrakcija, se za posamezen ekstrakt opravijo tri ponovne meritve. Vsak vzorec se ekstrahira samo enkrat.

▼M5

hormonov (kot je opisan v oddelku 5.0 Dodatka III k validacijskemu poročilu (4)) pri vseh razredčinah kemijskih založnih raztopin, da se opredeli odmerek, pri katerem se pojavi znaten (≥ 20 %) vpliv. Če je vpliv manjši od 30 %, se rezultati lahko popravijo za vpliv. Če vpliv preseže 30 %, so podatki neveljavni, pri čemer je treba podatke pri teh koncentracijah zavreči. Če se znaten vpliv preskusne kemikalije na sistem za merjenje hormonov pojavi pri več kot eni necitotoksični koncentraciji, je treba uporabiti drug sistem za merjenje hormonov. Da se prepreči vpliv zaradi kontaminacije s kemikalijami, se priporoča, da se hormoni iz gojišča ekstrahirajo z ustreznim topilom, pri čemer so možne metode navedene v validacijskem poročilu (4).

Tabela 1

Merila uspešnosti za sisteme za merjenje hormonov

Parameter	Merilo
Občutljivost metode merjenja	Meja določljivosti (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Učinkovitost ekstrakcije hormonov (samo, kadar je ekstrakcija potrebna)	Povprečne stopnje izkoristka (na podlagi treh ponovitev meritev) primešanih količin hormonov od dodane količine ne smejo odstopati za več kot 30 %.
Vpliv kemikalij (samo za sisteme na podlagi protiteles)	Znatna (≥ 30 % osnovne proizvodnje zadevnega hormona) navzkrižna reaktivnost s hormoni, ki jih proizvedejo celice, se ne sme pojaviti ([b]) ([c]).

([a]) *Opomba:* Meje meritve metode temeljijo na vrednostih osnovne proizvodnje hormonov iz tabele 5 in učinkovitosti. Če se lahko doseže večje osnovno proizvajanje hormonov, je lahko meja višja.

([b]) Nekatera protitelesa za T in E2 so lahko pri večjih deležih navzkrižno reaktivna z androstendionom in estronom. V takih primerih ni mogoče točno določiti učinkov na 17β-HSD. Vendar lahko podatki kljub temu zagotavljajo uporabne informacije o učinkih na proizvajanje estrogena ali androgena na splošno. V takih primerih je treba podatke izraziti kot odzive androgena/estrogena in ne kot E2 in T.

([c]) Ti vključujejo: holesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoksikortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon,17α-progesteron, deoksikortizol, kortizol, DHEA, androstendion, estron.

Preskus usposobljenosti laboratorija

33. Pred preskušanjem neznanih kemikalij je treba s preskusom usposobljenosti laboratorija dokazati, da je laboratorij usposobljen za doseganje in ohranitev ustrezne celične kulture ter preskusnih pogojev, ki so potrebni za uspešno izvedbo preskusa. Ker je uspešnost preskusa neposredno povezana z osebjem laboratorija, ki opravlja preskus, je treba te postopke delno ponoviti, če se osebje v laboratoriju zamenja.

34. Ta preskus usposobljenosti bo izveden pod enakimi pogoji, kot so navedeni v odstavkih 38 do 40, z izpostavitvijo celic 7 naraščajočim koncentracijam močnih, zmernih in šibkih povzročiteljev in zaviralcev ter negativni kemikaliji (glej tabelo 2). Kemikalije, ki jih je treba preskusiti, vključujejo zlasti močnega povzročitelja forskolin (št. CAS 66575-29-9), močnega zaviralca

▼M5

prokloraz (št. CAS 67747-09-5), zmernega povzročitelja atrazin (št. CAS 1912-24-9), zmernega zaviralca aminoglutetimid (št. CAS 125-84-8), šibkega povzročitelja (proizvajanje E2) in šibkega zaviralca (proizvajanje T) bisfenol A (št. CAS 80-05-7) ter negativno kemikalijo humani horionski gonadotropin (HCG) (št. CAS 9002-61-3), kot je navedeno v tabeli 2. Za vse kemikalije se vodijo ločene plošče, kot je prikazano v tabeli 6. Vsak dnevni preskus s kemikalijami za preskušanje usposobljenosti mora vključevati eno ploščo za kontrolo kakovosti (tabela 4, odstavka 36–37).

Tabela 2

Kemikalije za preverjanje usposobljenosti in koncentracije izpostavljenosti

Kemikalija za preskušanje usposobljenosti	Preskusne koncentracije (μM)
Prokloraz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) Kontrolni vzorec (0) s topilom (DMSO), 1 μl DMSO/jamico.

Izpostavljenost celic H295R kemikalijam za preskus usposobljenosti se izvede v ploščah s 24 jamicami med preskusom usposobljenosti laboratorija. Vsi odmerki preskusne kemikalije se odmerjajo v μM. Odmerki se dajejo v DMSO pri 0,1 % m/m na jamico. Vse preskusne koncentracije je treba preskusiti v treh ponovitvah (tabela 6). Za vsako kemikalijo se vodijo ločene plošče. Vsak dnevni preskus vključuje eno ploščo za kontrolo kakovosti.

35. Analize sposobnosti preživetja celic in hormonov je treba izvesti, kot je določeno v odstavkih 42 do 46. Mejno vrednost (najnižja koncentracija z opaženim učinkom, LOEC) in odločitev o razvrstitvi je treba sporočiti in primerjati z vrednostmi v tabeli 3. Podatki se štejejo za sprejemljive, če izpolnjujejo najnižjo koncentracijo z opaženim učinkom in odločitev o razvrstitvi iz tabele 3.

Tabela 3

Mejne vrednosti (LOEC) in odločitev o razvrstitvi kemikalij za preskušanje usposobljenosti

	Št. CAS	LOEC (μM)		Odločitev o razvrstitvi	
		T	E2	T	E2
Prokloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (zaviranje)	+ (zaviranje)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (povzročanje)	+ (povzročanje)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (povzročanje)	+ (povzročanje)
Aminoglute-timid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (zaviranje)	+ (zaviranje)

▼M5

	Št. CAS	LOEC (μM)		Odločitev o razvrstitvi	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (zaviranje)	+ (povzročanje)
HCG	9002-61-3	n. r.	n. r.	Negativno	Negativno

([a]) + : pozitivno.
N. r.: ni relevantno, ker ne sme biti sprememb po izpostavljenosti necitotoksičnim koncentracijam negativnega kontrolnega vzorca.

Plošča za kontrolo kakovosti

36. Plošča za kontrolo kakovosti se uporablja za preverjanje delovanja celic H295R pod normalnimi pogoji za kulture ter za vzpostavitev zbirke preteklih podatkov za koncentracije hormonov v kontrolnih vzorcih s topilom, pozitivnih in negativnih kontrolnih vzorcih ter za druge meritve kontrole kakovosti v daljšem obdobju.

— Delovanje celic H295R je treba oceniti s ploščo za preverjanje kakovosti za vsako novo serijo ATCC ali po prvi uporabi predhodno zamrznjene zaloge celic, razen če je bil preskus usposobljenosti laboratorija (odstavki 32–34) opravljen s to serijo celic.

— Plošča za kontrolo kakovosti zagotavlja popolno oceno preskusnih pogojev (npr. sposobnost preživetja celic, kontrolni vzorci s topilom, negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcev ter spremenljivost v preskusih in med njimi) pri preskušanju kemikalij in bi morala biti del vsake ponovitve preskusa.

37. Preskus kontrole kakovosti se izvede na plošči s 24 jamicami, pri čemer se upoštevajo enaki postopki inkubacije, odmerjanja, sposobnosti preživetja celice/citotoksičnosti, ekstrakcije hormonov in analize hormonov, kot so opisani v odstavkih 38 do 46 za preskušanje kemikalij. Plošča za kontrolo kakovosti zajema slepe vzorce, kontrolne vzorce s topili ter dve koncentraciji znanega povzročitelja (forskolin, 1, 10 μM) in zaviralca (prokloraz, 0,1, 1 μM) sinteze E2 in T. Poleg tega se v izbranih jamicah uporabi MeOH kot pozitivni kontrolni vzorec za preskus sposobnosti preživetja/citotoksičnost. Podroben opis razporeditve plošče je naveden v tabeli 4. Merila, ki jih mora plošča za kontrolo kakovosti izpolnjevati, so navedena v tabeli 5. Najmanjša osnovna proizvodnja hormonov za T in E2 mora biti izpolnjena tako v kontrolnem vzorcu s topilom kot v praznih jamicah.

Tabela 4

Razporeditev plošče za kontrolo kakovosti za preskušanje delovanja neizpostavljenih celic H295R ter celic, izpostavljenih znanim zaviralcem (PRO = prokloraz) in spodbujevalcem (FOR = forskolin) proizvajanja E2 in T. Po koncu preskusa izpostavljenosti in odstranitvi gojišča se vsem jamicam z MeOH doda 70-odstotna raztopina metanola, ki deluje kot pozitivni kontrolni vzorec za citotoksičnost (glej preskus citotoksičnosti v Dodatku III k validacijskemu poročilu (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Prazno ([a])	Prazno ([a])	Prazno ([a])	Prazno ([a]) (+ MeOH) ([b])	Prazno ([a]) (+ MeOH) ([b])	Prazno ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Celice v praznih jamicah prejmejo le gojišče (tj. nič topila).
([b]) Metanol (MeOH) se doda po koncu izpostavljenosti in ko je gojišče odstranjeno iz teh jamic.
([c]) Kontrolni vzorec s topilom DMSO (1 μl/jamico).

Tabela 5

Merila uspešnosti za ploščo za kontrolo kakovosti

	T	E2
Osnovna proizvodnja hormona v kontrolnem vzorcu s topilom (KVT)	≥ 5-kratnik meje določljivosti	≥ 2,5-kratnik meje določljivosti
Povzročanje (10 μM forskolina)	≥ 1,5-kratnik KVT	≥ 7,5-kratnik KVT
Zaviranje (1 μM prokloraza)	≤ 0,5-kratnik KVT	≤ 0,5-kratnik KVT

POSTOPEK KEMIČNE IZPOSTAVLJENOSTI

38. Predhodno inkubirane celice se odstranijo iz inkubatorja (odstavek 21) in preverijo pod mikroskopom, da se zagotovi, da so pred odmerjanjem v dobrem stanju (pritrditev, morfologija).

39. Celice se postavijo v biološko varno omaro, obogateno gojišče pa se odstrani in nadomesti z novim obogatenim gojiščem (1 ml/jamico). Priporočeno topilo za to metodo je DMSO. Če obstajajo razlogi za uporabo drugega topila, se to znanstveno utemelji. Celice so izpostavljene preskusni kemikaliji z dodajanjem 1 μl ustrezne založne raztopine v DMSO (glej Dodatek II k validacijskemu poročilu (4)) na 1 ml obogatenega gojišča (prostornina jamice). Tako je končna koncentracija v jamicah 0,1 % DMSO. Za zagotovitev ustreznega mešanja se na splošno priporoča, da se ustrezna založna raztopina preskusne kemikalije v DMSO zmeša z obogatenim gojiščem za pridobitev želene končne koncentracije posameznega odmerka, zmesi pa doda posamezni jamici takoj po odstranitvi starega gojišča. Če se uporabi ta možnost, mora koncentracija DMSO (0,1 %) ostati enaka v vseh jamicah. V jamicah, ki vsebujejo najvišji koncentraciji, se s stereomikroskopom vizualno oceni nastajanje oborine ali motnosti, ki kaže nepopolno topnost preskusne kemikalije. Če se opazita taki stanji (motnost, nastajanje oborine), se pregledajo tudi jamice, ki vsebujejo naslednje nižje koncentracije (in tako naprej), pri čemer se jamice, ki se niso v celoti spremenile v raztopino, izključijo iz nadaljnjega vrednotenja in analize. Plošča se za 48 ur vrne v inkubator pri 37 °C in 5 % CO_2 v atmosferi z zrakom. Razporeditev plošče s preskusno kemikalijo je prikazana v tabeli 6. Zaloge 1–7 kažejo razporeditev naraščajočih odmerkov preskusne kemikalije.

▼M5

Tabela 6

Shema odmerjanja za izpostavljenost celic H295R preskusnim kemikalijam v plošči s 24 jamicami

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Zaloga 4	Zaloga 4	Zaloga 4
B	Zaloga 1	Zaloga 1	Zaloga 1	Zaloga 5	Zaloga 5	Zaloga 5
C	Zaloga 2	Zaloga 2	Zaloga 2	Zaloga 6	Zaloga 6	Zaloga 6
D	Zaloga 3	Zaloga 3	Zaloga 3	Zaloga 7	Zaloga 7	Zaloga 7

40. Po 48 urah se izpostavljene plošče odstranijo iz inkubatorja, pri čemer se v vsaki jamici pod mikroskopom preverijo stanje celic (pritrditev, morfologija, stopnja konfluence) in znaki citotoksičnosti. Gojišče iz vsake jamice se razdeli na dva enaka dela (po približno 490 µl) ter prenese v dve ločeni in ustrezno označeni viali (tj. en alikvot za zagotovitev rezervnega vzorca za vsako jamico). Da se prepreči izsušitev celic, se gojišče odstrani iz ene vrstice ali stolpca naenkrat in nadomesti z gojiščem za preskus sposobnosti preživetja/citotoksičnosti celice. Če se sposobnost preživetja/citotoksičnost celice ne izmeri takoj, se v vsako jamico doda 200 µl PBS s Ca^{2+} in Mg^{2+}. Gojišča se zamrznejo pri – 80 °C do nadaljnje obdelave za analizo koncentracij hormonov (glej odstavke 44–46). Čeprav sta T in E2 v gojišču pri – 80 °C na splošno stabilna vsaj 3 mesece, je treba v vsakem laboratoriju dokumentirati stabilnost hormonov med shranjevanjem.

41. Takoj po odstranitvi gojišča se za vsako izpostavljeno ploščo določi sposobnost preživetja/citotoksičnost celic.

Določanje sposobnosti preživetja celice

42. Za določanje možnega vpliva preskusne kemikalije na sposobnost preživetja celice se lahko uporabi preskus sposobnosti preživetja/citotoksičnosti celice po izbiri. Preskus mora zagotoviti dejansko meritev odstotka celic, sposobnih preživetja, v jamici, ali dokazati, da je neposredno primerljiva s preskusom Live/Dead® (njegovo linearno funkcijo) (glej Dodatek III k validacijskemu poročilu (4)). Drugi preskus, ki dokazano deluje enako dobro, je preskus MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] (18). Ocena sposobnosti preživetja celic z uporabo zgornje metode je relativna meritev, ki ne kaže nujno linearnih povezav z absolutnim številom celic v jamici. Zato mora analitik izvesti vzporedno subjektivno vizualno oceno vsake jamice, pri čemer je treba posneti digitalne fotografije kontrolnih vzorcev s topilom ter vzeti dve največji necitotoksični koncentraciji in ju arhivirati, da se omogoči poznejša ocena dejanske gostote celic, če je to potrebno. Če se na podlagi vizualnega pregleda ali preskusa sposobnosti preživetja/citotoksičnosti zdi, da se je število celic povečalo, je treba to domnevno povečanje preveriti. Če se povečanje števila celic potrdi, je treba to navesti v poročilu o preskusu. Sposobnost preživetja celic bo izražena glede na povprečni odziv v kontrolnih vzorcih s topilom, ki se šteje kot 100-odstotna sposobnost preživetja celic, in se izračuna, kot je ustrezno za uporabljeni preskus sposobnosti preživetja/citotoksičnosti celic. Za preskus MTT se lahko uporabi naslednja formula:

▼M5

% celic, sposobnih preživetja = (odziv v jamici – povprečni odziv v jamicah, obdelanih z MeOH [= 100-odstotna smrtnost]) ÷ (povprečni odziv v jamicah preskusnih vzorcev s topilom – povprečni odziv v jamicah, obdelanih z MeOH [= 100-odstotna smrtnost]).

43. Jamice s sposobnostjo preživetja, manjšo od 80 % glede na povprečno sposobnost preživetja v kontrolnih vzorcih s topilom (= 100-odstotno preživetje), se ne smejo vključiti v analizo končnih podatkov. Zaviranje steroidogeneze, ki se pojavi ob prisotnosti skoraj 20-odstotne citotoksičnosti, je treba skrbno ovrednotiti za zagotovitev, da citotoksičnost ni vzrok za zaviranje.

Analiza hormonov

44. Vsak laboratorij lahko za analizo T in E2 uporabi sistem za merjenje hormonov po izbiri. Za pripravo razredčin se lahko uporabijo rezervni alikvoti gojišča iz posamezne tretirane skupine, da se koncentracija uskladi z linearnim delom umeritvene krivulje. Kot je navedeno v odstavku 29, mora vsak laboratorij dokazati skladnost svojega sistema za merjenje hormonov (npr. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) z merili kontrole kakovosti, tako da pred izvedbo kontrole kakovosti ali preskušanja kemikalij analizira gojišče s primešanim hormonom interne kontrole. Za zagotovitev, da deli preskusnega sistema ne vplivajo na meritev hormonov, bo hormone morda treba pred njihovim merjenjem ekstrahirati iz gojišča (glej odstavek 30 za pogoje, pod katerimi se ekstrakcija zahteva, in pogoje, pod katerimi se ne zahteva). Priporoča se izvedba ekstrakcije na podlagi postopkov iz Dodatka III k validacijskemu poročilu (4).

45. Če se za meritev proizvajanja hormonov uporablja komplet za preskušanje, ki je na voljo na tržišču, je treba analizo hormonov izvesti, kot je določeno v navodilih, ki jih je kompletu za preskušanje priložil proizvajalec. Večina proizvajalcev uporablja edinstven postopek za izvedbo analize hormonov. Razredčine vzorcev je treba prilagoditi tako, da bodo pričakovane koncentracije hormonov v kontrolnih vzorcih s topilom na sredini linearnega razpona umeritvene krivulje posameznega preskusa (Dodatek III k validacijskemu poročilu (4)). Vrednosti zunaj linearnega dela umeritvene krivulje je treba zavreči.

46. Končne koncentracije hormonov se izračunajo, kot sledi:

Primer:

Ekstrahirano:	450 µl gojišča
Obdelano v:	250 µl pufra za preskus
Razredčina pri preskusu:	1:10 (za uskladitev vzorca z linearnim razponom umeritvene krivulje)
Koncentracija hormonov pri preskusu:	150 pg/ml (že prilagojeno koncentraciji na ml preskušenega vzorca)
Izkoristek:	89 %
Končna koncentracija hormonov =	(Koncentracija hormonov (na ml) ÷ izkoristek) (faktor razredčenja)
Končna koncentracija hormonov =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Izbira preskusnih koncentracij

47. Izvesti je treba vsaj dva neodvisna poteka preskusa. Če predhodne informacije, kot so informacije o mejah topnosti ali citotoksičnosti, ne zagotavljajo podlage za izbiro preskusnih koncentracij, se priporoča, da se preskusne koncentracije za prvi potek preskusa razporedijo v intervalih $\log_{10}$, pri čemer je največja koncentracija 10^{-3} M. Če je kemikalija topna in ni citotoksična pri nobeni preskušeni koncentraciji ter je bil prvi potek preskusa negativen pri vseh koncentracijah, je treba to potrditi še z enim potekom preskusa z uporabo enakih pogojev kot pri prvem poteku preskusa (tabela 7). Če so rezultati prvega poteka preskusa *dvoumni* (tj. je faktor spremembe statistično značilen pri kontrolnem vzorcu z raztopino pri samo eni koncentraciji) ali pozitivni (tj. je faktor spremembe pri dveh ali več sosednjih koncentracijah statistično značilen), je treba preskus ponoviti, kot je navedeno v tabeli 7, z izboljšanjem izbranih preskusnih koncentracij. Preskusne koncentracije v drugem in tretjem poteku preskusa (če je primerno) je treba prilagoditi na podlagi rezultatov oklepajočih koncentracij iz prvega poteka preskusa, ki so sprožile učinek, z uporabo razporejanja koncentracij na podlagi 1/2-logaritma (npr. če so koncentracije 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 in 1 000 μM iz prvega poteka preskusa povzročile sproženje pri 1 in 10 μM, morajo biti koncentracije, preskušene v drugem poteku preskusa, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 in 100 μM), razen če je treba za doseganje najnižje koncentracije z opaženim učinkom uporabiti nižje koncentracije. V slednjem primeru je treba v drugem poteku preskusa z 1/2-logaritemsko skalo preskusiti vsaj pet koncentracij pod najnižjo koncentracijo, preskušeno pri prvem poteku preskusa. Če drugi potek preskusa ne potrdi prvega poteka (tj. se statistična značilnost ne pojavi pri predhodno pozitivno preskušeni koncentraciji ± 1 povečanje koncentracije), je treba izvesti tretji preskus z uporabo izvirnih preskusnih pogojev. Dvoumni rezultati prvega poteka preskusa se štejejo za negativne, če opaženega učinka ni mogoče potrditi v nobenem od naslednjih dveh potekov preskusa. Dvoumni rezultati se štejejo za pozitiven odziv (učinek), če je mogoče odziv potrditi pri vsaj še enem poteku preskusa v okviru povečanja koncentracije za ± 1 (glej oddelek 55 za postopek razlage podatkov).

Tabela 7

Matrika odločanja za možne scenarije rezultatov

Potek preskusa 1	Potek preskusa 2		Potek preskusa 3		Odločitev	
Scenarij	Odločitev	Scenarij	Odločitev	Scenarij	Pozitivno	Negativno
Negativno	Potrditev ([a])	Negativno	Konec			X
Negativno	Potrditev ([a])	Pozitivno	Izboljšanje ([b])	Negativno		X
Dvoumno ([c])	Izboljšanje ([b])	Negativno	Potrditev ([a])	Negativno		X
Dvoumno ([c])	Izboljšanje ([b])	Negativno	Potrditev ([a])	Pozitivno	X	
Dvoumno ([c])	Izboljšanje ([b])	Pozitivno			X	
Pozitivno	Izboljšanje ([b])	Negativno	Potrditev ([a])	Pozitivno	X	

▼M5

Potek preskusa 1	Potek preskusa 2		Potek preskusa 3		Odločitev	
Scenarij	Odločitev	Scenarij	Odločitev	Scenarij	Pozitivno	Negativno
Negativno	Potrditev ([a])	Pozitivno	Izboljšanje ([b])	Pozitivno	X	
Pozitivno	Izboljšanje ([b])	Pozitivno	Konec		X	

([a]) Potrditev prejšnjega poteka preskusa z uporabo enake zasnove preskusa.
([b]) Ponovitev preskusa pri razporeditvi koncentracij z 1/2-logaritmom (omejitev koncentracij, ki so se v predhodnem preskusu izkazale za znatno različne).
([c]) Razmerje spremembe pri eni koncentraciji se statistično znatno razlikuje od kontrolnega vzorca z raztopino.

Kontrola kakovosti preskusne plošče

48. Poleg izpolnjevanja meril kontrole kakovosti plošč je treba izpolniti tudi druga merila kakovosti iz tabele 8, ki se nanašajo na sprejemljive variacije med podvojenimi jamicami, podvojenimi preskusi, linearnostjo in občutljivostjo sistemov za merjenje hormonov, variabilnost med podvojenimi meritvami hormonov istega vzorca in odstotkom izkoristka hormonskih dodatkov po ekstrakciji gojišča (če je primerno; glej odstavek 30 o zahtevah glede ekstrakcije). Podatki morajo biti razvrščeni v sprejemljiva območja, opredeljena za posamezne parametre, da se upoštevajo pri nadaljnjem vrednotenju. Če ta merila niso izpolnjena, mora biti v razpredelnici navedeno, da zadevni vzorec ni izpolnjeval meril kontrole kakovosti in da ga je treba ponovno analizirati ali izločiti iz sklopa podatkov.

Tabela 8

Sprejemljiva območja in/ali variacije (%) za parametre preskusne plošče za preskus celic H295R

(LOQ: meja določljivosti sistema za meritev hormonov. KV: Koeficient variacije; KVT: kontrolni vzorec s topilom; DPM: razgradnje na minuto)

	Primerjava med	T	E2
Osnovna proizvodnja hormonov v KVT	Razmerje spremembe, večje od LOQ	≥ 5-kratna	≥ 2,5-kratna
Preskusi izpostavljenosti – v okviru KV plošče za KVT (podvojene jamice)	Absolutne koncentracije	≤ 30 %	≤ 30 %
Preskusi izpostavljenosti – med KV plošče za KVT (podvojeni preskusi)	Faktor spremembe	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistem merjenja hormonov – občutljivost	Zaznavno razmerje zmanjšanja glede na KVT	≥ 5-kratno	≥ 2,5-kratno
Sistem merjenja hormonov – KV podvojene meritve za KVT ([a])	Absolutne koncentracije	≤ 25 %	≤ 25 %
Ekstrakcija iz gojišča – izkoristek notranjega standarda 3H (če je primerno)	DPM	≥ 65 % nominalno	

([a]) Nanaša se na ponovljene meritve istega vzorca.

▼M5

ANALIZA PODATKOV IN POROČANJE

Analiza podatkov

49. Za vrednotenje relativnega povečanja/zmanjšanja kemijsko spremenjenega proizvajanja hormonov je treba rezultate normalizirati na srednjo vrednost kontrolnega vzorca s topilom vseh preskusnih plošč in rezultate izraziti kot spremembe glede na kontrolne vzorce s topilom na posamezni preskusni plošči. Vse podatke je treba izraziti kot srednjo vrednost ± 1 standardni odklon.

50. V analizo podatkov je treba vključiti le podatke o hormonih iz jamic, kjer je bila citotoksičnost manjša od 20 %. Relativne spremembe je treba izračunati, kot sledi:

relativna sprememba = (koncentracija hormonov v posamezni jamici) ÷ (srednja koncentracija hormonov v vseh jamicah s kontrolnim vzorcem s topilom).

51. Če se na podlagi vizualnega pregleda jamice ali preskusa sposobnosti preživetja/citotoksičnosti iz odstavka 42 zdi, da se je število celic povečalo, je treba to domnevno povečanje preveriti. Če se povečanje števila celic potrdi, je treba to navesti v poročilu o preskusu.

52. Pred izvedbo statistične analize je treba opraviti vrednotenje predpostavke normalnosti in homogenosti variance. Normalnost je treba ovrednotiti z uporabo standardnih verjetnostnih grafikonov ali drugih ustreznih statističnih metod (npr. Shapiro-Wilkov preskus). Če podatki (razmerja sprememb) niso normalno porazdeljeni, jih je treba poskusiti približati normalni porazdelitvi s pretvorbo. Če so podatki normalno porazdeljeni ali so blizu normalne porazdelitve, je treba razlike med skupinami koncentracij kemikalije in kontrolnim vzorcem s topilom analizirati z uporabo parametričnega preskusa (npr. Dunnettov preskus), pri čemer je *koncentracija* neodvisna, *odziv* (faktor spremembe) pa odvisna spremenljivka. Če so podatki normalno porazdeljeni, je treba uporabiti neparametrični preskus (npr. Kruskal-Wallisov preskus, Steelov preskus). Razlike se štejejo za značilne, kadar je $p \leq 0{,}05$. Statistična vrednotenja se opravijo na podlagi povprečnih vrednosti posamezne jamice, ki predstavlja neodvisne podatkovne točke s podvojitvami. Pričakuje se, da zaradi velikega razmika med odmerki v prvem poteku preskusa (skala $\log_{10}$) v veliko primerih ne bo mogoče opisati jasne odvisnosti med koncentracijo in odzivom, kjer bosta dva največja odmerka na linearnem delu sigmoidne krivulje. Zato se za prvi potek preskusa ali kateri koli drug sklop podatkov, pri katerem se pojavi to stanje (npr. kadar ni mogoče oceniti največje učinkovitosti), uporabi statistika s stalno spremenljivko tipa I, opisana zgoraj.

53. Če na linearnem delu krivulje ležita več kot dve podatkovni točki in kadar je mogoče izračunati največje učinkovitosti, kot je predvideno za nekatere od drugih potekov preskusa, ki se izvedejo z uporabo pollogaritemske razporeditve koncentracij izpostavljenosti, je treba za izračun učinkovitih koncentracij (npr. EC50 in EC20) uporabiti verjetnostni, logaritemski ali drug ustrezen regresijski model.

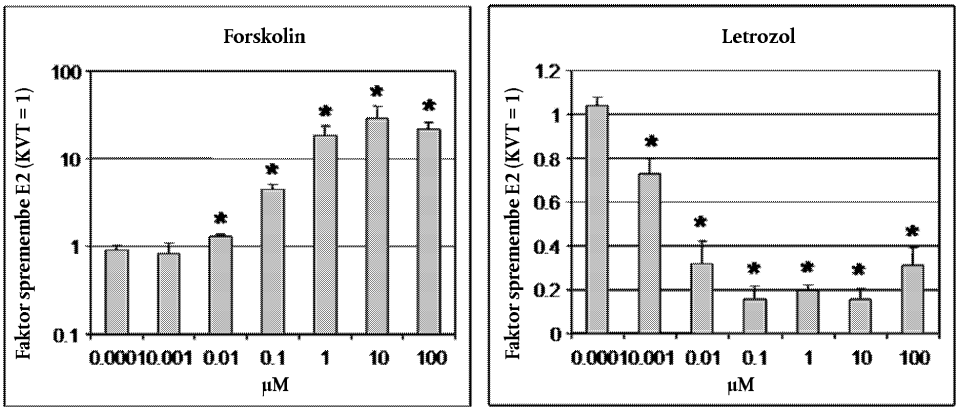
54. Rezultate je treba predstaviti v grafični (palični grafikon, ki predstavlja srednjo vrednost +/– 1 standardni odklon) in tabelarni (najnižja koncentracija z opaženim učinkom/koncentracija brez opaznega učinka, smer učinka in moč največjega odziva, ki je del dela podatkov o odvisnosti med odmerkom in odzivom) obliki (za primer glej sliko 3). Ocena podatkov se šteje za veljavno le, če je temeljila na vsaj dveh neodvisno izvedenih potekih preskusa. Preskus ali potek preskusa se šteje za neodvisen, če je bil izveden na drug dan z uporabo novega kompleta raztopin in kontrolnih vzorcev. Obseg koncentracij, uporabljen v drugem in tretjem poteku preskusa (če je potrebno), se lahko prilagodi na podlagi rezultatov prvega poteka preskusa, da se bolje opredeli območje odziva na odmerek, ki vsebuje najnižjo koncentracijo z opaženim učinkom (glej odstavek 47).

▼M5

Slika 3

Primer predstavitve in vrednotenja podatkov, pridobljenih med izvajanjem preskusa celic H295R, v grafični in tabelarni obliki

(Zvezdice označujejo statistično značilne razlike kontrolnega vzorca s topilom ($p < 0,05$). LOEC: najnižja koncentracija z opaženim učinkom; največja sprememba: največja moč odziva, opažena pri kateri koli koncentraciji, v primerjavi s povprečnim odzivom kontrolnega vzorca s topilom (= 1))



Kemikalija	LOEC	Največja sprememba
Forskolin	0,01	0,15-kratna
Letrozol	0,001	29-kratna

Postopek razlage podatkov

55. Preskusna kemikalija se oceni za pozitivno, če se razmerje indukcije statistično razlikuje ($p \leq 0,05$) od kontrolnega vzorca s topilom v dveh sosednjih koncentracijah v vsaj dveh neposredno opravljenih potekih preskusa (tabela 7). Preskusa kemikalija se oceni za negativno na podlagi dveh neodvisnih negativnih potekov preskusa ali v treh potekih preskusa, ki zajemata dva negativna poteka preskusa in en dvoumen ali pozitiven potek preskusa. Če podatki, pridobljeni v treh neodvisnih preskusih, ne izpolnjujejo meril za odločitev iz tabele 7, rezultatov preskusa ni mogoče interpretirati. Rezultati pri koncentracijah, ki presegajo meje topnosti, ali pri citotoksičnih koncentracijah ne smejo biti vključeni v razlago rezultatov.

Poročilo o preskusu

56. Poročilo o preskusu mora vključevati naslednje informacije:

Preskuševalni laboratorij:

— ime in kraj laboratorija,

— vodjo študije ter drugo osebje in njihove pristojnosti v zvezi s študijo,

— datum začetka študije in datum konca študije.

▼**M5**

Preskusna kemikalija, reagenti in kontrolni vzorci:

— identiteto (ime, št. CAS, kot je ustrezno), vir, številko lota/serije, čistoto, dobavitelja ter opredelitev preskusne kemikalije, reagentov in kontrolnih vzorcev,

— agregatno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije,

— pogoje shranjevanja ter metodo in pogostost priprave preskusnih kemikalij, reagentov in kontrolnih vzorcev,

— stabilnost preskusne kemikalije.

Celice:

— vir in vrsto celic,

— število celičnih pasaž (identifikator celične pasaže) celic, uporabljenih v preskusu,

— opis postopkov za ohranitev celičnih kultur.

Zahteve pred preskušanjem (če je ustrezno):

— opis in rezultate preskusa vpliva kemikalij na preskus hormonov,

— opis in rezultate meritev učinkovitosti ekstrakcije hormonov,

— umeritvene in umeritvene krivulje za vse analitične preskuse, ki jih je treba izvesti,

— meje zaznavnosti za izbrane analitične preskuse.

Preskusni pogoji:

— sestavo gojišča,

— koncentracijo preskusne kemikalije,

— gostoto celic (ocenjena ali izmerjena koncentracija celic po 24 urah in 48 urah),

— topnost preskusne kemikalije (meja topnosti, če je določena),

— čas in pogoje inkubacije.

Rezultati preskusa:

— neobdelane podatke za vse jamice za kontrolne vzorce in preskusne kemikalije – vsako podvojeno meritev v obliki izvirnih podatkov, pridobljenih z instrumentom, uporabljenim za meritev proizvajanja hormonov (npr. optična gostota, enote fluorescence, razgradnja na minuto itd.),

— validacijo normalnosti ali razlago pretvorbe podatkov,

— srednjo vrednost odzivov ± 1 standardni odklon za vsako izmerjeno jamico,

— podatke o citotoksičnosti (preskusne koncentracije, ki so povzročile citotoksičnost),

— potrditev, da so bile zahteve glede kontrole kakovosti izpolnjene,

▼M5

— relativno spremembo v primerjavi s kontrolnim vzorcem s topilom, s popravkom za citotoksičnost,

— palični grafikon, ki kaže relativno spremembo (razmerje spremembe) pri posamezni koncentraciji, standardni odklon in statistično značilnost, kot je navedeno v odstavkih 49–54.

Razlaga podatkov:

— uporabo postopka za razlago podatkov za rezultate in razpravo o ugotovitvah.

Razprava:

— ali v študiji obstajajo znaki za možnost, da bi lahko na podatke o T/E2 vplivali posredni učinki na glukokortikoidne in mineralokortikoidne poti?

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, v Dodatku 2 k poglavju B.54 te priloge.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114–124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23–30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Na voljo na [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html].

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Na voljo na: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html].

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Na voljo na: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf].

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78–89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44–54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777–2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137–1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

(16) Poglavje B.55 te priloge: Hershbergerjev biološki preskus na podganah: kratkotrajni presejalni preskus za (anti)androgene lastnosti.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598–1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

▼M5

Dodatek

OPREDELITEV POJMOV:

Konfluentnost se nanaša na pokritje ali množitev, ki je celicam dovoljena v gojišču kulture ali čez njega.

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

KV pomeni koeficient variacije in je opredeljen kot razmerje med standardnim odklonom porazdelitve in njegovo aritmetično sredino.

CYP pomeni citokrom P450 mono-oksigenaze, družino genov in encimov, ki jih proizvajajo, ki sodelujejo pri katalizi različnih biokemijskih reakcij, vključno s sintezo in presnovo steroidnih hormonov.

DPM pomeni število razgradenj na minuto. To je število atomov v dani količini radioaktivne snovi, za katero se zazna, da razpade v eni minuti.

E2 je 17β-estradiol, tj. najpomembnejši estrogen v sistemih sesalcev.

Celice **H295R** so človeške adenokarcinomske celice, ki imajo fiziološke lastnosti consko nediferenciranih človeških fetalnih celic nadledvičnice in izražajo vse encime steroidogenezne poti. Zagotavlja jih ATCC.

Gojišče za zamrzovanje se uporablja za zamrzovanje in shranjevanje zamrznjenih celic. Zajema založno gojišče ter BD Nu-Serum in dimetilsulfoksid.

Linearni razpon je razpon v okviru umeritvene krivulje za sistem meritve hormonov, kjer so rezultati sorazmerni s koncentracijo analita, prisotnega v vzorcu.

LOQ je kratica za 'mejo določljivosti' in je najmanjša količina kemikalije, ki jo je mogoče razločiti od odsotnosti kemikalije (slepa vrednost) v dani meji zaupanja. Za namen te metode mejo določljivosti običajno opredeli proizvajalec preskusnih sistemov, če ni določeno drugače.

LOEC je najnižja koncentracija z opaženim učinkom, tj. najmanjša raven koncentracije, pri kateri se odziv pri preskusu statistično razlikuje od odziva kontrolnega vzorca s topilom.

NOEC je koncentracija brez opaznega učinka, ki je najvišja preskušena koncentracija, če pri preskusu ni pozitivnega odziva.

Pasaža je število delitev celic po iniciaciji kulture iz zamrznjene zaloge. Začetna pasaža, ki se je začela iz zamrznjene zaloge, ima številko ena (1). Celice, ki so se delile enkrat, so označene kot pasaža 2 itd.

PBS je Dulbeccov fosfatni pufer s soljo.

Kontrola kakovosti, okrajšano QC, pomeni ukrepe, ki so potrebni za zagotovitev veljavnih podatkov.

Plošča za kontrolo kakovosti je plošča s 24 jamicami, ki vsebuje dve koncentraciji pozitivnih in negativnih kontrolnih vzorcev za spremljanje uspešnosti nove serije celic ali zagotavljanje pozitivnih kontrolnih vzorcev za preskušanje kemikalij.

Ponovitev je neodvisen preskus z novim kompletom raztopin in kontrolnih vzorcev.

▼**M5**

Založno gojišče je osnova za pripravo drugih reagentov. Sestavljen je iz zmesi Dulbeccovega gojišča Modified Eagle in Hamove zmesi hranil F-12 (DMEM/F12) v razmerju 1:1 v 15 mM pufra HEPES brez fenol rdečega ali natrijevega bikarbonata. Natrijev bikarbonat se doda kot pufer; glej Dodatek II k validacijskemu poročilu (4).

Obogateno gojišče zajema založno gojišče ter BD Nu-Serum in visokokakovostno zmes ITS+; glej Dodatek II k validacijskemu poročilu (4).

Steroidogeneza je pot sinteze, ki vodi od holesterola do različnih steroidnih hormonov. Več vmesnih produktov na poti sinteze steroidov, kot sta progesteron in testosteron, je pomembnih hormonov samih po sebi, vendar delujejo tudi kot predhodne sestavine za hormone nižje na poti sinteze.

T pomeni testosteron, enega od dveh najpomembnejših androgenov v sistemu sesalcev.

Preskusna kemikalija je katera koli snov ali zmes, ki se preskuša s to preskusno metodo.

Preskusna plošča je plošča, na kateri so celice H295R izpostavljene preskusnim kemikalijam. Preskusne plošče vsebujejo kontrolni vzorec s topilom in preskusno kemikalijo v sedmih stopnjah koncentracije v treh ponovitvah.

Tripsin 1X je razredčena raztopina encima tripsina, tj. serinska proteaza trebušne slinavke, ki se uporablja za odstopitev celic s plošče za gojenje; glej Dodatek III k validacijskemu poročilu (4).

▼M5

B.58 PRESKUS GENSKIH MUTACIJ NA SOMATSKIH IN KLIČNIH CELICAH GENSKO SPREMENJENIH GLODAVCEV

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD št. 488 (2013). Na voljo so preskusne metode EU za številne preskuse mutacij *in vitro*, ki lahko odkrijejo kromosomske in/ali genske mutacije. Obstajajo tudi preskusne metode za končne točke *in vivo* (tj. kromosomske aberacije in nenačrtna sinteza DNA); vendar pa te metode ne merijo genskih mutacij. Preskusi mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih (TGR) izpolnjujejo potrebo po praktičnih in splošno razširjenih preskusih genskih mutacij *in vivo*.

2. Preskusi mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih so bili obsežno pregledani (24) (33). Uporabljajo se gensko spremenjene podgane in miši z večkratnimi kopijami v kromosome vključenih prenosljivih vektorjev na osnovi plazmida ali faga. Transgeni vsebujejo poročevalske gene za odkrivanje različnih vrst mutacij, ki so jih preskusne kemikalije povzročile *in vivo*.

3. Mutacije pri glodavcih se ocenijo s pridobitvijo transgena in analizo fenotipa poročevalskega gena v bakterijskem gostitelju, ki nima poročevalskega gena. Preskusi genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih merijo mutacije, povzročene pri genetsko nevtralnih genih, pridobljenih iz praktično katerega koli tkiva glodavca. Ti preskusi zato zaobidejo številne omejitve, povezane s proučevanjem genskih mutacij v endogenih genih *in vivo* (npr. omejeno število tkiv, primernih za analizo, negativna/pozitivna selekcija za mutacije).

4. Iz dokazov je razvidno, da se transgeni na mutagene odzivajo podobno kot endogeni geni, zlasti glede substitucije baznih parov, premikov bralnega okvira ter majhnih delecij in insercij (24).

5. Pri International Workshops on Genotoxicity Testing (mednarodna delavnica o preskušanju genotoksičnosti, IWGT) so odobrili vključitev preskusov genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih za odkrivanje genskih mutacij *in vivo* in priporočili protokol za njihovo izvajanje (15) (29). Ta preskusna metoda temelji na teh priporočilih. Za nadaljnjo analizo, ki podpira uporabo tega protokola, glej (16).

6. Pričakuje se, da bo v prihodnosti preskus genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih mogoče združiti s študijo strupenosti s ponavljajočim se odmerkom (poglavje B.7 te priloge). Potrebni so podatki, ki bi zagotovili, da krajše, enodnevno obdobje med koncem obdobja odmerjanja in vzorčenjem iz študije strupenosti s ponavljajočim se odmerkom, ki pri preskusih genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih traja 3 dni, ne vpliva na občutljivost preskusa genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih. Potrebni so tudi podatki, ki kažejo, da uporaba seva gensko spremenjenih glodavcev namesto običajnih sevov glodavcev ne vpliva na uspešnost preskusa s ponavljajočim se odmerkom. Ko bodo ti podatki na voljo, bo ta preskusna metoda posodobljena.

7. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku.

▼**M5**

ZAČETNI PREUDARKI

8. Preskusi genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih, za katere je na voljo dovolj podatkov, ki podpirajo njihovo uporabo v tej preskusni metodi, so: miš z bakteriofagom z genom *lacZ* (Muta™Mouse); miš s plazmidom z genom *lacZ*; miš in podgana, ki sta *gpt* in Spi$^-$ negativni; miš in podgana z genom *lacI* (Big Blue®) pod standardnimi pogoji. Poleg tega se lahko preskus pozitivne selekcije gena *cII* uporabi za vrednotenje mutacij v modelih Big Blue® in Muta™Mouse. Mutageneza pri modelih TGR se običajno oceni kot pogostnost mutantov; če je potrebno, pa se lahko dodatne informacije pridobi z molekularno analizo mutacij (glej odstavek 24).

9. Ti preskusi genskih mutacij *in vivo* pri glodavcih so posebno primerni za ocenjevanje nevarnosti mutagenosti, ker so odzivi preskusov odvisni od presnove *in vivo,* farmakokinetike in popravljanja DNA, čeprav so ti lahko različni pri različnih vrstah, tkivih in vrstah poškodb DNA. Preskus *in vivo* za genske mutacije je koristen tudi za nadaljnjo preiskavo mutagenih učinkov, odkritih pri sistemu *in vitro,* in za spremljanje rezultatov preskusov z uporabo drugih končnih točk *in vivo* (24). Poleg tega, da je vzročno povezana z nastankom raka, je genska mutacija pomembna končna točka za napoved nerakastih bolezni na podlagi mutacij pri somatskih tkivih (12) (13) in bolezni, ki se prenašajo prek zarodne linije.

10. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali zadevni metabolit ne bosta dosegla interesnih tkiv, izvajanje preskusa genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih ni primerno.

NAČELO PRESKUSNE METODE

11. V preskusih, opisanih v odstavku 8, je tarčni gen po izvoru bakterijski ali bakteriofag, iz genomske DNA glodavcev pa se pridobi z vključitvijo transgena v prenosljivi vektor na osnovi bakteriofaga λ ali plazmida. Pri postopku je potrebna ekstrakcija genomske DNA iz interesnega tkiva glodavcev, obdelava genomske DNA *in vitro* (tj. pakiranje vektorjev λ ali ligacija in elektroporacija plazmidov za pridobitev prenosljivega vektorja), in posledično odkritje mutacij v bakterijskih gostiteljih pod ustreznimi pogoji. V preskusih se uporabljajo nevtralni transgeni, ki se zlahka pridobijo iz večine tkiv.

12. Osnovni preskus genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih obsega tretiranje glodavca v določenem obdobju. Kemikalije se lahko dajejo na kateri koli primerni način, vključno z vsaditvijo (npr. preskušanje medicinskih pripomočkov). Celotno obdobje, v katerem žival prejema odmerek, se imenuje obdobje odmerjanja. Odmerjanju običajno sledi obdobje pred usmrtitvijo, med katerim žival ne prejema kemikalije in med katerim se nepopravljene poškodbe DNA ustalijo kot stabilne mutacije. V virih se to obdobje različno imenuje sprememba, ustalitev ali izražanje; ob koncu tega obdobja sledi vzorčenje (15) (29). Po usmrtitvi živali se genomski DNA izolira iz interesnih tkiv in prečisti.

▼M5

13. Podatki za eno samo tkivo na žival iz več pakiranj/ligacij se ponavadi združijo in pogostnost mutantov se običajno ovrednoti z uporabo skupno med 10^5 in 10^7 enot, ki delajo plake ali kolonije. Pri uporabi metod s pozitivno selekcijo se skupno število enot, ki tvorijo plake, določi z ločenim sklopom neselektivnih plošč.

14. Metode s pozitivno selekcijo so se razvile zaradi poenostavitve odkrivanja mutacij pri genu *gpt* (*gpt* delta miš in podgana, *gpt*⁻ fenotip (20) (22) (28)) in genu *lacZ* (Muta™Mouse ali miš s plazmidom z genom *lacZ* (3) (10) (11) (30)); genske mutacije *lacI* v živalih Big Blue® se odkrivajo z neselektivno metodo, ki mutante opredeli s proizvajanjem obarvanih (modrih) plakov. Metodologija pozitivne selekcije je v uporabi tudi za odkrivanje točkovnih mutacij v genu *cII* prenosljivega vektorja na osnovi bakteriofaga λ [miš ali podgana Big Blue® in miš Muta™Mouse (17)] in delecijske mutacije v λ *rdečih* in *gam* genih (selekcija Spi⁻ v miši in podgani z genom *gpt* (21) (22) (28)). Pogostnost mutantovse izračuna tako, da se število plakov/plazmidov z mutacijami v transgenu deli s skupnim številom plakov/plazmidov, pridobljenih iz istega vzorca DNA. Sporočeni parameter pri preskusih genskih mutacij pri gensko spremenjenih glodavcih je pogostnost mutantov. Poleg tega je pogostnost mutantov mogoče določiti kot del celic, ki prenašajo neodvisne mutacije; pri tem izračunu je potreben popravek za klonalno ekspanzijoz določanjem zaporedja pridobljenih mutantov (24).

15. Mutacije v preskusih točkovnih mutacij v genih *lacI, lacZ, cII* in *gpt* so v glavnem sestavljene iz mutacij substitucij baznih parov, premikov bralnega okvira ter majhnih insercij/delecij. Sorazmerni delež teh vrst mutacij med spontanimi mutacijami je podoben kot pri tistem v endogenem genu *Hprt.* Obsežne delecije je mogoče zaznati samo v preskusih s selekcijo Spi⁻ in plazmidom *lacZ* (24). Interesne mutacije so mutacije *in vivo* v miši ali podgani. Mutacije *in vitro* in *ex vivo*, ki se lahko pojavijo med pridobivanjem, podvajanjem ali popravilom fagov/plazmidov, so relativno redke, v nekaterih sistemih pa jih lahko bakterijski gostitelj/sistem pozitivne selekcije posebej identificira ali izključi.

OPIS PRESKUSNE METODE

Priprava

Izbira živalskih vrst

16. Na voljo so številni modeli za odkrivanje genskih mutacij v gensko spremenjeni miši, njihova uporaba pa je bolj razširjena od modelov z gensko spremenjeno podgano. Če je podgana očitno primernejši model od miši (npr. pri preiskovanju mehanizma karcinogeneze za tumor, ki se pojavi samo pri podganah, za povezavo s študijami strupenosti pri podganah, ali če je presnova podgane bolj reprezentativna za človeško presnovo), je treba razmisliti o uporabi modelov z gensko spremenjeno podgano.

Nastanitveni in prehranjevalni pogoji

17. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi naj bo 22 °C (± 3 °C). Čeprav naj bi bila relativna vlažnost vsaj 30 % in naj po možnosti ne bi presegala 70 %, razen v času čiščenja prostora, bi cilj moral biti ohranjanje 50–60-odstotne relativne vlažnosti. Osvetlitev naj bo umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja

▼M5

konvencionalna laboratorijska prehrana z neomejeno oskrbo s pitno vodo. Na izbiro prehrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Če agresivno vedenje ni pričakovano, je treba živali namestiti v majhnih skupinah (po največ pet živali) istega spola. Če je to znanstveno upravičeno, so lahko živali nameščene posamično.

Priprava živali

18. Zdrave mlade spolno zrele odrasle živali (ob začetku tretiranja stare 8–12 tednov) se naključno razdelijo v kontrolne in tretirane skupine. Živali se označijo z edinstvenimi oznakami. Živali se vsaj pet dni prilagajajo na laboratorijske razmere. Kletke je treba razporediti tako, da so možni učinki zaradi njihovega položaja čim manjši. Ob začetku študije naj bo razlika med težami živali čim manjša in naj ne presega ± 20 % srednje vrednosti teže vsakega spola.

Priprava odmerkov

19. Trdne preskusne kemikalije naj se pred odmerjanjem živalim raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih ali primešajo prehrani ali pitni vodi. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola, odvisno od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Preskusni pogoji

Topilo/nosilec

20. Topilo/nosilec pri uporabljenih količinah odmerkov naj nima strupenih učinkov in naj se zanj ne sumi, da kemično reagira s preskusno kemikalijo. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj bo njihova uporaba podprta z referenčni podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/nosilca.

Pozitivni kontrolni vzorci

21. Običajno je treba hkrati uporabiti živali pozitivne kontrole. Laboratoriji, ki so dokazali usposobljenost (glej odstavek 23) in redno izvajajo te preskuse, lahko za potrditev uspešnosti metode v vsako študijo vključijo DNA tretiranih živali iz prejšnjih pozitivnih kontrol. DNA iz prejšnjih preskusov je treba pridobiti iz istih vrst in interesnih tkiv ter primerno shraniti (glej odstavek 36). Pri uporabi hkratnih pozitivnih kontrolnih vzorcev ni treba, da se odmerjajo na enak način kot preskusna kemikalija, vendar pa mora zanje biti znano, da povzročajo mutacije v vsaj enem interesnem tkivu za preskusno kemikalijo. Odmerke kemikalije pozitivne kontrole je treba izbrati tako, da bodo sprožili blage ali zmerne učinke, na podlagi katerih bo mogoče kritično oceniti uspešnost in občutljivost preskusa. Primeri kemikalij pozitivne kontrole in nekatera njihova tarčna tkiva so navedeni v tabeli 1.

▼M5

Tabela 1

Primeri kemikalij pozitivne kontrole in nekatera njihova tarčna tkiva

Kemikalije pozitivne kontrole in njihove št. CAS	Ime EINECS in št. EINECS	Značilnosti	Tarčno tkivo mutacije	
			Podgana	Miš
N-etil-N-nitrozosečnina [št. CAS 759-73-9]	N-etil-N-nitrozosečnina [212-072-2]	Neposredno delujoč mutagen	Jetra, pljuča	Kostni mozeg, debelo črevo, epitelij debelega črevesa, črevesje, jetra, pljuča, vranica, ledvice, granulozne celice v jajčnikih, moške klične celice
Etil karbamat (uretan) [št. CAS 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, potrebna je presnova, a ima samo blage učinke		Kostni mozeg, predželodec, tanko črevo, jetra, pljuča, vranica
2,4-diaminotoluen [št. CAS 95-80-7]	4-metil-m-fenilendiamin [202-453-1]	Mutagen, potrebna je presnova, pozitiven je tudi v preskusu s Spi^-	Jetra	Jetra
Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]	Benzo[def]krizen [200-028-5]	Mutagen, potrebna je presnova	Jetra, omentum	Kostni mozeg, prsi, debelo črevo, predželodec, žlezni želodec, srce, jetra, pljuča, moške klične celice

Negativni kontrolni vzorci

22. Negativne kontrolne vzorce, tretirane samo s topilom ali nosilcem, drugače pa tretirane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti v vsako vzorčenje. Če pretekli ali objavljeni podatki ne dokazujejo, da izbrano topilo/nosilec ne povzroča nobenih škodljivih ali mutagenih učinkov, se v vsako vzorčenje vključijo neobdelani kontrolni vzorci, da se dokaže sprejemljivost kontrole nosilca.

Preverjanje strokovnosti laboratorija

23. Usposobljenost za izvajanje teh preskusov se dokaže s prikazom zmožnosti ponovitve pričakovanih rezultatov iz objavljenih podatkov (24) za: 1) pogostnost mutacij s kemikalijami pozitivne kontrole (vključno z blagimi odzivi), kot so kemikalije iz tabele 1, nemutageni in kontrole nosilca, in 2) pridobivanje transgena iz genomskega DNA (npr. učinkovitost pakiranja).

Določanje zaporedja mutantov

24. Za regulativno uporabo določanje zaporedja DNA mutantov ni potrebno, zlasti če je dobljen jasen pozitiven ali negativen rezultat. Podatki o določanju zaporedja pa so lahko koristni pri pojavu visoke interindividualne variacije. V teh primerih se lahko določanje zaporedja uporabi za izključitev pojava velikega števila mutantov (t. i. jackpots) ali klonov z opredelitvijo edinstvenih mutantov v določenem tkivu. Določanje zaporedja približno 10 mutantov na tkivo na žival bi moralo zadoščati za preprosto ugotavljanje, ali klonski mutanti prispevajo k pogostnosti mutantov; za matematično popravo pogostnosti mutantov za klonskost bo morda potrebnih tudi do

▼M5

25 mutantov. Določanje zaporedja mutantov bo morda potrebno tudi pri manjšem povečanju pogostnosti mutantov (tj. ki komaj presežejo vrednosti v neobdelanih kontrolnih vzorcih). Razlike v spektru mutantov med kolonijami mutantov v tretiranih in netretiranih živalih bodo morda podprle mutageni učinek (29). Spektri mutantov so lahko koristni tudi za razvoj mehanističnih hipotez. Ko naj bi bilo določanje zaporedja vključeno v protokol študije, je treba biti posebej pazljiv pri načrtovanju takšnih študij, zlasti glede števila mutantov z določenim zaporedjem na vzorec, da se doseže ustrezna moč glede na uporabljen statistični model (glej odstavek 43).

POSTOPEK

Število in spol živali

25. Vnaprej določeno število živali na skupino mora biti tolikšno, da se zagotovi statistična moč, potrebna za odkrivanje vsaj podvajanja pogostnosti mutantov. Skupine naj bodo sestavljene iz vsaj pet živali; če je statistična moč premajhna, je treba povečati število živali po potrebi. Običajno se uporabijo živali moškega spola. V nekaterih primerih bi bilo morda preskušanje samo samic upravičeno; na primer pri preskušanju zdravil, ki jih tipično uporabljajo ženske, ali raziskovanju presnove, značilne za ženske. Če so med spoloma glede strupenosti ali presnove velike razlike, bo potrebno preskušanje na samcih in samicah.

Obdobje odmerjanja

26. Na podlagi ugotovitev, da se mutacije kopičijo z vsakim tretiranjem, je potreben režim s ponavljajočimi se odmerki, in sicer dnevnim tretiranjem prek 28 dni. Na splošno naj bi bilo to dovolj časa, da šibki mutageni nakopičijo dovolj mutacij, izpostavljenost pa dovolj dolga, da je mogoče odkriti mutacije v počasi množečih se organih. Za nekatera vrednotenja so morda primerni tudi drugi režimi tretiranja, te druge razporede dajanja odmerkov pa je treba znanstveno upravičiti v protokolu. Tretiranje mora trajati vsaj toliko časa, kolikor je potrebnega za popolno indukcijo vseh zadevnih presnovnih encimov, pri krajših tretiranjih pa bo morda potrebno večkratno vzorčenje, ki je primerno za organe z različnimi stopnjami namnoževanja. V vsakem primeru je treba pri utemeljitvi protokola uporabiti vse razpoložljive informacije (npr. o splošni strupenosti ali presnovi in farmakokinetiki), zlasti pri odstopanju od navedenih standardnih priporočil. Sicer lahko tretiranje, daljše od 8 tednov poveča občutljivost, vendar ga je treba jasno razložiti in utemeljiti, saj lahko dolgo tretiranje povzroči navidezno povečanje pogostnosti mutantov zaradi klonalne ekspanzije (29).

Velikost odmerkov

27. Velikosti odmerkov naj temeljijo na rezultatih študije za ugotavljanje območja za merjenje splošne strupenosti, ki je bila opravljena z enakim načinom izpostavljenosti, ali pa na rezultatih že obstoječih študij subakutne strupenosti. Za določanje območij odmerkov se lahko uporabijo gensko nespremenjene živali istega seva glodavcev. Da bi se dobile informacije o odzivu na odmerek, je treba v glavnem preskusu v celotno študijo vključiti negativno kontrolno skupino (glej odstavek 22) in najmanj tri ustrezno razporejene velikosti odmerka, razen če se uporabi mejni odmerek (glej

▼M5

odstavek 28). Največji odmerek bi moral biti največji tolerančni odmerek (MTD). Največji tolerančni odmerek je odmerek, ki povzroči takšne znake strupenosti, da se pričakuje, da bi večji odmerki pri istem režimu odmerjanja povzročili smrt. Snovi s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, nestrupenih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerka in naj se ovrednotijo za vsak primer posebej. Uporabljene velikosti odmerkov naj zajemajo območje od največje strupenosti do majhne strupenosti ali nestrupenosti.

Mejni preskus

28. Če preskusi za ugotavljanje območja odmerkov ali obstoječi podatki povezanih sevov glodavcev kažejo, da režim tretiranja z najmanj mejnim odmerkom (glej v nadaljevanju) ne povzroči nobenih opaznih učinkov strupenosti in če se na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh ne pričakuje, da bo snov genotoksična, se lahko pojmuje, da popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov ni potrebna Pri 28-dnevnem obdobju odmerjanja (tj. 28 dnevnih tretiranj) je mejni odmerek 1 000/mg/kg telesne teže/dan. Pri največ 14-dnevnem obdobju odmerjanja je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže/dan (razporede odmerjanja, ki se razlikujejo od 28 dnevnih tretiranj, je treba znanstveno utemeljiti v protokolu; glej odstavek 26).

Dajanje odmerkov

29. Navadno se preskusna kemikalija daje z gavažo po želodčni cevki ali ustrezni intubacijski kanili. Na splošno je treba pri načrtovanju študije upoštevati predviden način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato so sprejemljivi tudi drugi načini izpostavljanja (pitna voda, podkožno, intravenozno, lokalno, vdihavanje, intratrahealno, s prehrano ali vsadkom), kadar se lahko utemeljijo. Dajanje z intraperitonealno injekcijo ni priporočeno, saj ni fiziološko pomemben način izpostavljenosti pri ljudeh. Največja količina tekočine, ki se lahko naenkrat da z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih količin je treba utemeljiti. Razen pri dražečih ali jedkih kemikalijah, ki pri višjih koncentracijah navadno povzročajo močnejše učinke, je treba variabilnost preskusne količine s prilagajanjem koncentracije obdržati na kar najnižji ravni, da bi zagotovili konstantno količino pri vseh odmerkih.

Vzorčenje

Somatske celice

30. Vzorčenje je pomembna spremenljivka, ker je določeno z obdobjem, potrebnim za ustalitev mutacije. To obdobje je odvisno od tkiva in je očitno povezano z obnavljanjem populacije celic, pri čemer se kostni mozeg in črevesje hitro odzivata, jetra pa precej počasneje. Ustrezen kompromis za merjenje pogostnosti mutantov v hitro in počasi se množečih tkivih je 28 zaporednih dni tretiranja (kot je navedeno v odstavku 26) in vzorčenje tri dni po zadnjem tretiranju; mogoče pa je, da v takih pogojih v počasi se množečih tkivih ne bo prišlo do največje pogostnosti mutantov. Če so počasi množeča se tkiva še posebej pomembna, bo morda primernejše poznejše obdobje vzorčenja 28 dni po 28 dneh dajanja odmerkov (16) (29). V takih primerih bi poznejše vzorčenje zamenjalo tridnevno vzorčenje, za kar bi bila potrebna znanstvena utemeljitev.

▼M5

Klične celice

31. Preskusi pri gensko spremenjenih glodavcih so primerni za študijo povzročanja mutacije genov v moških kličnih celicah (7) (8) (27), pri kateri sta čas in kinetika spermatogeneze dobro opredeljeni (27). Ker je število jajčnih celic, ki so na voljo za analizo, nizko celo po superovulaciji in zaradi dejstva, da v oocitih sinteza DNA ne poteka, za določanje mutacij v ženskih kličnih celicah ni mogoče uporabiti transgenskih preskusov (31).

32. Časi vzorčenja moških kličnih celic morajo biti izbrani tako, da so vzorčene različne vrste izpostavljenih celic v različnih fazah razvoja klične celice in da je bila tarčna faza vzorčenja dovolj izpostavljena. Obdobje, v katerem klične celice napredujejo od zarodnih celic iz spermatogonijev do zrele sperme, ki doseže semenovode/repe obmodkov, traja ~ 49 dni pri miši (36) in ~ 70 dni pri podgani (34) (35). Po 28-dnevnem izpostavljanju, ki mu sledi tridnevno vzorčenje, bo seme, odvzeto iz semenovodov/repov obmodkov (7) (8), predstavljalo populacijo celic, izpostavljenih med približno zadnjo polovico spermatogeneze, ki obsega mejotično in postmejotično obdobje, ne pa tudi obdobja spermatogonijev ali zarodnih celic. Da bi bile celice v semenovodih/repih obmodkov, ki so bile zarodne celice spermatogonijev v obdobju izpostavljenosti, ustrezno vzorčene, je po končanem tretiranju potrebno dodatno vzorčenje vsaj 7 tednov (pri miši) ali 10 tednov (pri podgani).

33. Celice, pridobljene iz semenskih cevk po režimu 28 dni + 3 dnevi, predstavljajo mešano populacijo, obogateno za vse faze kličnih celic v razvoju (7) (8). Ocena faz, v katerih so povzročene mutacije klične celice, z vzorčenjem teh celic za odkrivanje genske mutacije ni tako natančna kot z vzorčenjem semenčic iz semenovodov/repov obmodkov (ker se iz cevk odvzamejo vzorci številnih različnih celic in bo nekaj somatskih celic to populacijo celic kontaminiralo). Vendar pa so z vzorčenjem iz semenskih cevk in semenčic iz semenovodov/repov obmodkov po režimu vzorčenja samo 28 dni + 3 dnevi v določeni meri zajete celice, izpostavljene v večini razvojnih faz klične celice, kar je lahko koristno za odkrivanje nekaterih mutagenov kličnih celic.

Opazovanja

34. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Zabeležiti je treba podatke o zdravstvenem stanju živali. Živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za določitev obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati vsaj enkrat tedensko in ob usmrtitvi. Meritve porabe hrane je treba opraviti vsaj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode pri vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo nesmrtonosne znake čezmerne strupenosti, je treba usmrtiti pred koncem preskusnega obdobja (23).

▼M5

Odvzem tkiv

35. Odvzem tkiv je treba jasno utemeljiti. Ker je povzročanje mutacij mogoče proučevati v skoraj vsakem tkivu, je treba tkiva, ki bodo odvzeta, izbrati na podlagi razlogov za izvajanje študije in obstoječih podatkih o mutagenosti, rakotvornosti ali strupenosti za preskuševano kemikalijo. Pomembni dejavniki, ki jih je treba upoštevati, so način dajanja (na podlagi verjetnih načinov izpostavljenosti pri ljudeh), predvidena razporeditev tkiv in možni mehanizem delovanja. Če ni nobenih osnovnih informacij, je treba odvzeti več morebitnih interesnih somatskih tkiv. Ta tkiva naj bi predstavljala hitro množeča se in počasi množeča se tkiva ter tkiva, ki so mesto kontakta. Poleg tega je treba odvzeti semenčice iz semenovodov/repov obmodkov in klične celice v razvoju iz semenskih cevk (kakor je opisano v odstavkih 32 in 33) ter jih shraniti za primer, če bo v prihodnosti potrebna analiza mutagenosti kličnih celic. Pridobiti je treba podatke o teži organov, pri večjih organih pa je treba odvzeti isto območje pri vseh živalih.

Shranjevanje tkiv in DNA

36. Tkiva (ali homogenate tkiv) je treba shraniti pri najmanj – 70 °C, za izolacijo DNA pa jih je treba uporabiti v 5 letih. Izolirano DNA, shranjeno v hladilniku v primernem pufru pri 4 °C, je treba za analizo mutacij uporabiti v 1 letu.

Izbor tkiv za analizo mutantov

37. Izbira tkiva mora temeljiti na preudarkih, kot so: 1) način dajanja ali mesto prvega kontakta (npr. žlezni želodec pri dajanju oralno, pljuča pri dajanju z vdihavanjem ali koža pri lokalnem nanašanju); in 2) farmakokinetični parametri iz študij splošne strupenosti, ki kažejo na razporeditev, zadrževanje ali kopičenje v tkivih, ali tarčnih organih za strupenost. Če se izvajajo študije za nadaljnje spremljanje študij rakotvornosti, je treba upoštevati tarčna tkiva rakotvornosti. Izbira tkiv za analizo naj bi kar najbolj pripomogla k odkrivanju kemikalij, ki so neposredno delujoči mutageni *in vitro*, hitro metabolizirane, zelo reaktivne ali pa se slabo absorbirajo, ali pa kemikalij, pri katerih se tarčno tkivo določi z načinom dajanja (6).

38. Če ni nobenih osnovnih informacij, je treba ob upoštevanju mesta kontakta zaradi načina dajanja za mutagenost ovrednotiti jetra in vsaj eno hitro se množeče tkivo (npr. žlezni želodec, kostni mozeg). V večini primerov je mogoče navedene zahteve izpolniti z analizo dveh skrbno izbranih tkiv, v nekaterih primerih pa bodo potrebna vsaj tri tkiva. Če obstajajo razlogi za posebno zaskrbljenost glede učinkov kličnih celic, vključno s pozitivnimi odzivi v somatskih celicah, je treba tkiva kličnih celic ovrednotiti za mutacije.

Merilne metode

39. Za priporočene gensko spremenjene modele so na voljo standardne laboratorijske ali objavljene metode za odkrivanje mutantov: lambda bakteriofag in plazmid *lacZ* (30); miš *lacI* (2) (18); miš delta *gpt* (22); podgana delta *gpt* (28); *cII* (17). Prilagoditve je treba utemeljiti in ustrezno dokumentirati. Podatki iz več poskusov pakiranja se lahko združijo in uporabijo za doseganje zadostnega števila plakov ali kolonij. Če je za dosego ustreznega števila plakov potrebnih veliko reakcij pakiranja, to lahko kaže na slabo kakovost DNA. V takih primerih je treba podatke obravnavati previdno, saj so morda niso zanesljivi. Optimalno skupno število plakov ali kolonij na vzorec DNA določa statistična verjetnost odkrivanja zadostnega števila

▼M5

mutantov pri določeni spontani pogostnosti mutantov. Na splošno je potrebnih najmanj 125 000 do 300 000 plakov, če je spontana pogostnost mutantov v višini 3×10^{-5} (15). Pri preskusu Big Blue® *lacI* je treba dokazati, da je mogoče z vključitvijo ustreznih barvnih kontrol hkrati z vsakim nanosom odkriti celotno območje barvnih fenotipov mutantov. Tkiva in vzorce (elemente) slednjih je treba obdelati in analizirati z razdelitvijo v bloke, pri čemer se elementi iz kontrolne skupine z nosilcem/topilom, pozitivne kontrolne skupine (če se uporablja) ali DNA pozitivnega kontrolnega vzorca (če je primerno) in vsake tretirane skupine obdelajo skupaj.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

40. Podatki za posamezne živali naj bodo prikazani v tabelah. Preskusna enota je žival. Poročilo naj vsebuje skupno število enot, ki delajo plake ali kolonije, število mutantov in pogostnost mutantov za vsako tkivo vsake živali. Če izvedemo več reakcij pakiranja/sproščanja fagov, je treba sporočiti število reakcij na posamezni vzorec DNA. Sicer je treba shraniti podatke za vsako posamezno reakcijo, vendar je treba sporočiti samo skupno število enot, ki delajo plake ali kolonije. Sporočiti je treba podatke o strupenosti in kliničnih znakih v skladu z odstavkom 34. Morebitne rezultate določanja zaporedja je treba predstaviti za vsak analizirani mutant in izračune pogostnosti mutantov prikazati za vsako žival in tkivo.

Statistično vrednotenje in razlaga rezultatov

41. Za določitev pozitivnega rezultata obstaja več meril, na primer povečanje pogostnosti mutantov, povezano z odmerkom, ali očitno povečanje pogostnosti mutantov v skupini z enim odmerkom v primerjavi s kontrolno skupino s topilom/nosilcem. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmerek, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine. Najprej naj se prouči biološka pomembnost rezultatov, pri vrednotenju rezultatov preskusa pa se kot pomoč lahko uporabijo ustrezne statistične metode (4) (14) (15) (25) (26). V uporabljenih statističnih preskusih naj bo preskusna enota žival.

42. Preskusno kemikalijo, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril v katerem od tkiv, je treba v tem preskusu šteti za nemutageno. Za biološko pomembnost negativnega rezultata je treba potrditi izpostavljenost tkiva.

43. Za analize določanja zaporedja DNA so za pomoč pri razlagi rezultatov na voljo številni statistični pristopi (1) (5) (9) (19).

44. Upoštevanje tega, ali so dobljene vrednosti v razponu preteklih kontrol ali zunaj njega, lahko zagotovi smernice pri ocenjevanju biološke pomembnosti odziva (32).

▼M5

Poročilo o preskusu

45. Poročilo o preskusu mora vključevati naslednje podatke:

Preskusna kemikalija:

— identifikacijske podatke in št. CAS, če je znana,

— izvor, številko serije, če je na voljo,

— agregatno stanje in čistoto,

— fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije,

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Topilo/nosilec:

— utemeljitev izbire uporabljenega nosilca,

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/nosilcu, če sta znani,

— pripravo pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje,

— analitične ugotovitve o pripravkih (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije).

Preskusne živali:

— uporabljeno vrsto/sev in utemeljitev izbire,

— število, starost in spol živali,

— izvor, nastanitvene razmere, hrano itd.,

— težo posameznih živali na začetku preizkusa, skupaj z območjem, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

— podatke o pozitivnih in negativnih (nosilec/topilo) kontrolnih vzorcih,

— podatke iz študije za ugotavljanje območja,

— utemeljitev izbire velikosti odmerka,

— podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije,

— podrobne podatke o dajanju preskusne kemikalije,

— utemeljitev načina dajanja,

— metode za merjenje strupenosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostost opazovanja živali in tehtanja,

— v primeru negativnih rezultatov metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla tarčno tkivo ali krvni obtok,

▼M5

— dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), preračunan na podlagi koncentracije preskusne kemikalije v hrani/pitni vodi (ppm) in porabe, če je primerno,

— podrobne podatke o kakovosti hrane in vode,

— podroben opis razporedov tretiranj in vzorčenj ter utemeljitev izbir,

— metode usmrtitve,

— postopke za izolacijo in hrambo tkiv,

— metode za izolacijo genomske DNA pri glodavcih, reševanje transgena iz genomske DNA in prenos transgene DNA v bakterijskega gostitelja,

— izvor in številko serij za vse celice, komplete in reagente (kjer je primerno),

— metode za štetje mutantov,

— metode za molekularno analizo mutantov in uporabo pri popravi za klonskost in/ali izračun pogostnosti mutantov, če je primerno.

Rezultati:

— stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki strupenosti,

— telesno težo in težo organov ob usmrtitvi,

— za vsako tkivo/žival število mutantov, število ovrednotenih plakov ali kolonij, pogostnost mutantov,

— za vsako skupino tkiv/živali število reakcij v obliki pakiranj na posamezni vzorec DNA, skupno število mutantov, povprečno pogostnost mutantov, standardni odklon,

— odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,

— za vsako tkivo/žival število neodvisnih mutantov in povprečno pogostnost mutantov, če je bila izvedena molekularna analiza mutantov,

— podatke o hkratni in pretekli negativni kontroli z območji, povprečji in standardnimi odkloni,

— podatke o hkratni pozitivni kontroli (ali nehkratni pozitivni kontroli za DNA),

— analitične ugotovitve, če so na voljo (npr. koncentracija DNA pri pakiranju, podatki o določanju zaporedja DNA),

— uporabljene statistične analize in metode.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

▼**M5**

VIRI

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391–396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res*., 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659.

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice' *, Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485–7489.

(8) Douglas, G.R*.,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res*., 388(2-3): 197–212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res*., 543: 125–136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A*.,* S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi^- and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi^- Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, str. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1–2): 117–123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^{o} 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, str. 1071–1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Dodatek

OPREDELITEV POJMOV:

Obdobje odmerjanja: celotno obdobje, v katerem žival prejema odmerek.

Substitucija baznih parov: vrsta mutacije, ki povzroči zamenjavo enega samega nukleotidnega baznega para v DNA z drugim nukleotidnim baznim parom DNA.

Kapsida: proteinski plašč, ki ovija virusni delec.

Kemikalija: snov ali zmes.

Klonalna ekspanzija: nastanek številnih celic iz ene same (mutirane) celice.

Enote, ki delajo kolonije: merilo števila bakterij, sposobnih za razmnoževanje.

Konkatemer: dolga neprekinjena biomolekula, ki jo sestavlja več enakih kopij, povezanih v serijo.

Kohezivni konec: odsek enoverižne DNA z 12 nukleotidi, ki je na obeh koncih dvovijačnega genoma bakteriofaga lambda.

Delecija: mutacija, pri kateri genom izgubi enega ali več (zaporednih) nukleotidov.

Elektroporacija: uporaba električnih impulzov za povečanje prepustnosti celičnih membran.

Endogeni gen: gen, ki izvira iz genoma.

Povečana binomska porazdelitev: večja variabilnost pri ponovitvi ocene deleža populacije, kot bi bila pričakovana, če bi imela populacija binomsko porazdelitev.

Premik bralnega okvira: genetska mutacija, ki jo povzročijo insercije ali delecije števila nukleotidov, ki ni enakomerno deljivo s tri v zaporedju DNA, ki kodira za proteine/peptide.

Insercija: v zaporedje DNA je dodan najmanj en nukleotidni bazni par.

Jackpot: veliko število mutantov, ki s klonalno ekspanzijo nastanejo iz ene same mutacije.

Obsežne delecije: delecije v DNA, ki obsegajo več kot nekaj kilobaz (učinkovito se jih odkriva v preskusih s selekcijo Spi^- in plazmidom lacZ).

Ligacija: kovalentno povezovanje dveh koncev molekul DNA z ligazo DNA.

Mitogen: kemikalija, ki celico spodbudi k celični delitvi, sproži mitozo (tj. celično delitev).

Nevtralni gen: gen, na katerega ne vplivajo pozitivni ali negativni selektivni pritiski.

Pakiranje: sinteza infektivnih bakteriofagnih delcev od priprave kapside bakteriofaga in proteinov repa in konkatemer molekul DNA bakteriofaga. Običajno se uporablja za pakiranje DNA, klonirano na vektor lambda (ločeno s kohezivnimi konci) v infekciozne delce lambde.

Učinkovitost pakiranja: učinkovitost, s katero so pakirani bakteriofagi integrirani v bakteriji gostiteljici.

▼**M5**

Enote, ki delajo plake: merilo števila bakteriofagov, sposobnih za razmnoževanje.

Točkovna mutacija: splošni izraz za mutacijo, ki vpliva le na majhno zaporedje DNA, vključno z majhnimi insercijami, delecijami in zamenjavami baznih parov.

Pozitivna selekcija: metoda, ki preživetje omogoči samo mutantom.

Poročevalski gen: gen, pri katerem se hitro odkrije mutirani genski produkt.

Vzorčenje: konec obdobja, pred usmrtitvijo, med katerim žival ne prejema kemikalije in med katerim se nepopravljene poškodbe DNA fiksirajo v stabilne mutacije.

Vektor za prenos: vektor, ki je zgrajen tako, da se lahko razširi v dveh različnih vrstah gostiteljev; zato je mogoče DNA, vstavljeno v prenosljivi vektor, preskušati ali jo obravnavati v dveh različnih vrstah celic ali dveh različnih organizmih.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušana s to preskusno metodo.

Transgensko: iz, se nanaša na ali pa je organizem, pri katerem je prišlo do spremembe genoma zaradi prenosa gena ali genov iz druge vrste.

▼M7

B.59 PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN CHEMICO*: NEPOSREDNI PRESKUS REAKTIVNOSTI PEPTIDOV (DPRA)

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 442C (2015). Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]). Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in chemico* (Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) – neposredni preskus reaktivnosti peptidov), ki ga je treba uporabiti v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN in uredbo CLP.

Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Obstoječe znanje o kemijskih in bioloških mehanizmih, povezanih s preobčutljivostjo kože, je povzeto v obliki poteka neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2) od začetnega dogodka na molekulski ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa pri ljudeh ali kontaktne preobčutljivosti pri glodalcih. Pri poteka neželenega izida preobčutljivosti kože je začetni dogodek na molekulski ravni kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože.

Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, ki temelji na morskih prašičkih, tj. Magnusson–Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GMPT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (3)), se proučuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitacije. Lokalna analiza bezgavk pri miših (Local Lymph Node Assay – LLNA, PM B.42 (4)) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (5)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (6)), ki vse ocenjujejo le indukcijski odziv, so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi pa morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.

Pred kratkim pa sta se kot znanstveno veljavni za ocenjevanje nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože začeli šteti preskusni metodi *in chemico* ter *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih. Da bi bilo mogoče v celoti nadomestiti testiranja na živalih, ki se trenutno uporabljajo, pa bodo potrebne kombinacije metod, ki se ne izvajajo na živalih (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), pri čemer se upošteva omejeno mehanistično kritje poteka neželenega izida pri vsaki od trenutno razpoložljivih preskusnih metod, ki se ne izvajajo na živalih (2) (7).

Predlagano je, da bi DPRA kot začetni dogodek poteka neželenega izida preobčutljivosti kože na molekulski ravni, tj. reaktivnost beljakovin, obravnaval tako, da bi se reaktivnost preskusnih kemikalij količinsko opredelila glede na vzorčne sintetične peptide, ki vsebujejo lizin ali cistein (8). Odstotne vrednosti izgube peptidov za cistein in lizin se nato uporabijo za razvrstitev snovi v enega od štirih razredov reaktivnosti, s čimer se podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože (9).

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M7

Preskus DPRA, ki je bil ocenjen v validacijski študiji pod vodstvom Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing – EURL ECVAM), nato pa še z naknadnim neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki sta ga izvedla EURL ECVAM in Znanstveni svetovalni odbor (ESAC), je bil ocenjen kot znanstveno veljaven (10) za uporabo kot del IATA, da se podpre razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnosti in označevanje. V virih poročajo o primerih uporabe podatkov iz preskusa DPRA v kombinaciji z drugimi informacijami (11) (12) (13) (14).

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI, UPORABNOST IN OMEJITVE

Korelacija med reaktivnostjo beljakovin in potencialom za povzročanje preobčutljivosti kože je dobro dokazana (15) (16) (17). Vendar ker je vezava na beljakovine le en ključni dogodek, čeprav je začetni dogodek poteka neželenega izida preobčutljivosti kože na molekulski ravni, informacije o reaktivnosti beljakovin, pridobljene s preskusnimi in nepreskusnimi metodami, kot take morda ne zadostujejo za ugotovitev, da kemikalija nima potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato je treba podatke, pridobljene s to preskusno metodo, obravnavati v okviru celostnih pristopov, kot je IATA, in jih združiti z drugimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki poteka neželenega izida preobčutljivosti kože, ter nepreskusnimi metodami, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh.

Ta preskusna metoda se lahko v kombinaciji z drugimi dopolnilnimi informacijami uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v okviru IATA. Te preskusne metode ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitiven rezultat pri preskusu DPRA kot tak mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

Izkazalo se je, da se preskus DPRA lahko prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje z analizo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (high-performance liquid chromatography – HPLC). Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusni metodi, je v enem laboratoriju 85-odstotna, v več laboratorijih pa 80-odstotna (10). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (18) in objavljenimi študijami (19), na splošno kažejo, da je točnost preskusa DPRA pri razlikovanju povzročiteljev preobčutljivosti (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 80-odstotna (N = 157), pri čemer je občutljivost v primerjavi z rezultati pri preskusu LLNA 80-odstotna (88/109), specifičnost pa 77-odstotna (37/48). Pri preskusu DPRA je bolj verjetno, da se podceni vrednost kemikalij z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pa kemikalij z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (18) (19). Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus DPRA kot samostojno preskusno metodo zgolj okvirne, saj jo je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA in v skladu z določbami odstavka 9. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih razmer v proučevani vrsti, tj. pri človeku, ne odražajo v celoti. Na podlagi splošno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus DPRA lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (8) (9) (10) (19). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus DPRA uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože.

▼M7

Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo preskusa DPRA za preskušanje snovi in/ali zmesi. Ta preskusna metoda se ne uporablja za preskušanje kovinskih spojin, saj je znano, da z beljakovinami reagirajo z mehanizmi, ki niso kovalentna vezava. Preskusna kemikalija mora biti topna v ustreznem topilu v končni koncentraciji 100 mM (glej odstavek 18). Za preskusne kemikalije, ki niso topne pri tej koncentraciji, pa se lahko še vedno preskusi, ali so topne pri nižjih koncentracijah. V takem primeru je s pozitivnim rezultatom še vedno mogoče podpreti opredelitev, da je preskusna kemikalija povzročiteljica preobčutljivosti kože, iz negativnega rezultata pa ni mogoče izpeljati trdnega sklepa o pomanjkanju reaktivnosti. Za zdaj so na voljo omejene informacije o uporabnosti preskusa DPRA za zmesi z znano sestavo (18) (19). Preskus DPRA se kljub temu šteje kot tehnično uporaben za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi z znano sestavo (glej odstavek 18). Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba proučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki premisleki niso potrebni. Sedanjega modela za napovedovanje zaradi določenega molskega razmerja preskusne kemikalije in peptida ni mogoče uporabiti za kompleksne zmesi z neznano sestavo ali snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksne reakcijske produkte ali biološke materiale (npr. snovi UVCB). Za to bo treba razviti nov model za napovedovanje, ki temelji na gravimetričnem pristopu. Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za druge posebne kategorije kemikalij, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti.

Ta preskusna metoda je metoda *in chemico*, ki ne zajema metabolnega sistema. Z njo ni mogoče zaznati kemikalij, pri katerih je za prikaz njihovega potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože potrebna encimska bioaktivacija (tj. pro-haptenov). Poroča se, da se s preskusno metodo v nekaterih primerih pravilno zaznajo kemikalije, ki postanejo povzročiteljice preobčutljivosti kože po abiotski pretvorbi (tj. pre-hapteni) (18). Glede na navedeno je treba negativne rezultate, pridobljene s preskusno metodo, razlagati v okviru navedenih omejitev in v povezavi z drugimi viri informacij v okviru IATA. Pri preskusnih kemikalijah, ki se na peptid ne vežejo kovalentno, temveč spodbujajo njegovo oksidacijo (tj. dimerizacija cisteina), se lahko preceni vrednost izgubljanja peptidov, zaradi česar so možni lažni pozitivni rezultati in/ali razvrstitev v višji razred reaktivnosti (glej odstavka 29 in 30).

Kot je navedeno, preskus DPRA podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (11). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi se lahko na podlagi rezultatov preskusa DPRA ocenila stopnja povzročanja preobčutljivosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskus DPRA je metoda *in chemico*, s katero se količinsko opredeli preostala koncentracija peptida, sestavljenega iz cisteina ali lizina, po 24-urni inkubaciji s preskusno kemikalijo pri 25 ± 2,5 °C. Sintetični peptidi vsebujejo fenilalanin, ki pomaga pri odkrivanju. Relativna koncentracija peptidov se meri s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z gradientno elucijo in UV-detekcijo pri 220 nm. Nato se izračunajo odstotne vrednosti izgube peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina, ter uporabijo v napovednem modelu (glej odstavek 29), kar omogoča razvrstitev preskusne kemikalije v enega izmed štirih razredov reaktivnosti, s katerimi se podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

▼M7

Pred redno uporabo metode, opisane pri tej preskusni metodi, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.

POSTOPEK

Ta preskusna metoda temelji na protokolu DPRA DB-ALM št. 154 (20), tj. protokolu, ki se uporablja v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM. Priporočljivo je, da se ta protokol uporablja pri izvajanju in uporabi te metode v laboratoriju. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki v preskusu DPRA. V primeru uporabe alternativnega sistema HPLC je treba prikazati, da je enakovreden validiranemu sistemu v protokolu DB-ALM (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2).

Priprava peptidov, sestavljenih iz cisteina ali lizina

Tik pred inkubacijo s preskusno kemikalijo je treba sveže pripraviti osnovne raztopine cisteina (Ac-RFAA**C**AA-COOH) in lizina (Ac-RFAA**K**AA-COOH), ki vsebujejo sintetične peptide, katerih stopnja čistosti je višja od 85 % in po možnosti v razponu od 90 do 95 %. Končna koncentracija peptida, sestavljenega iz cisteina, mora biti 0,667 mM v fosfatnem pufru z vrednostjo pH 7,5, končna koncentracija peptida, sestavljenega iz lizina, pa 0,667 mM v pufru amonijevega acetata z vrednostjo pH 10,2. Določiti je treba zaporedje ponovitev HPLC, da analiza HPLC ne traja dlje kot 30 ur. Pri sistemu HPLC, uporabljenem v tej validacijski študiji in opisanem v tej preskusni metodi, je mogoče v eno samo ponovitev HPLC vključiti do 26 vzorcev za analizo (ki vključujejo preskusno kemikalijo, pozitivno kontrolo in ustrezno število kontrol s topilom, in sicer glede na število posameznih topil, uporabljenih v preskusu, pri čemer se vsak preskusi v treh ponovitvah). Pri vseh ponovljenih vzorcih, analiziranih v isti ponovitvi, je treba uporabiti enake osnovne raztopine peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina. Priporočljivo je, da se pred uporabo dokaže ustrezna topnost posameznih serij peptidov.

Priprava preskusne kemikalije

Pred izvedbo preskusa je treba oceniti topnost preskusne kemikalije v ustreznem topilu po postopku solubilizacije, opisanem v protokolu DPRA DB-ALM (20). Ustrezno topilo povsem raztopi preskusno kemikalijo. Ker je pri preskusu DPRA preskusna kemikalija inkubirana v velikem presežku s peptidi, sestavljenimi iz cisteina ali lizina, vizualni pregled nastajanja jasne raztopine zadostuje, da se ugotovi, ali je preskusna kemikalija (in vse njene sestavine v primeru preskušanja snovi z več sestavinami ali zmesi) raztopljena. Ustrezna topila so acetonitril, voda, zmes vode in acetonitrila v razmerju 1: 1, izopropanol, aceton ali zmes acetona in acetonitrila v razmerju 1: 1. Uporabijo se lahko tudi druga topila, če ne vplivajo na stabilnost peptidov, kar se nadzoruje z referenčnimi kontrolnimi vzorci C (tj. vzorci, sestavljenimi iz zgolj peptidov, raztopljenih v ustreznem topilu; glej Dodatek 3). Če preskusna kemikalija ni topna v nobenem od teh topil, jo je treba kot zadnjo možnost poskusiti raztopiti v 300 µL dimetil sulfoksida (DMSO) in nastalo raztopino razredčiti z 2 700 µL acetonitrila; če preskusna kemikalija ni topna v tej zmesi, je treba poskusiti enako količino preskusne kemikalije raztopiti v 1 500 µL DMSO in nastalo raztopino razredčiti z 1 500 µL acetonitrila. Preskusno kemikalijo je treba vnaprej stehtati v steklenih vialah in tik pred preskušanjem raztopiti z ustreznimi topili, da se pripravi 100 mM raztopina. Za zmesi in snovi z več sestavinami z znano sestavo je treba določiti enotno čistost, tako da se seštejejo deleži njihovih sestavin (razen vode), enotno

▼M7

navidezno molekulsko maso pa je treba določiti tako, da se upoštevajo posamezne molekulske mase vsake sestavine v zmesi (razen vode) in njihova posamezna razmerja. Dobljena čistost in navidezna molekulska masa se nato uporabita pri izračunu teže preskusne kemikalije, ki je potrebna za pripravo 100 mM raztopine. Za polimere, pri katerih prevladujoče molekulske mase ni mogoče določiti, se lahko za pripravo 100 mM raztopine uporabi molekulska masa monomera (ali navidezna molekulska masa različnih monomerov, ki sestavljajo polimer). Pri preskušanju zmesi, snovi z več sestavinami ali polimerov z znano sestavo pa je treba razmisliti tudi o preskušanju čiste kemikalije. Pri tekočinah je treba preskusiti čisto kemikalijo kot tako brez predhodnega razredčenja, tako da se s peptidi, sestavljenimi iz cisteina, inkubira v molskem razmerju 1: 10, s peptidi, sestavljenimi iz lizina, pa v molskem razmerju 1: 50. Pri trdnih snoveh je treba preskusno kemikalijo raztopiti do največje možne topne koncentracije v istem topilu, kot je bilo uporabljeno za pripravo navidezne 100 mM raztopine. Nato jo je treba preskusiti kot tako brez dodatnega razredčenja, tako da se s peptidi, sestavljenimi iz cisteina, inkubira v razmerju 1: 10, s peptidi, sestavljenimi iz lizina, pa v razmerju 1: 50. Na podlagi skladnih rezultatov (reaktivnih ali nereaktivnih) med navidezno 100 mM raztopino in čisto kemikalijo je mogoče zanesljivo sklepati o rezultatu.

Priprava pozitivnega kontrolnega vzorca, referenčnih kontrolnih vzorcev in koelucijskih kontrolnih vzorcev

Za pozitivni kontrolni vzorec je treba uporabiti cimetov aldehid (št. CAS 104-55-2; s prehransko stopnjo čistosti ≥ 95 %) v koncentraciji 100 mM v acetonitrilu. Uporabijo se lahko tudi drugi primerni pozitivni kontrolni vzorci, ki po možnosti zagotavljajo srednje vrednosti izgubljanja, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Poleg tega je treba referenčne kontrolne vzorce (tj. vzorce, ki vsebujejo le peptid, raztopljen v ustreznem topilu) vključiti v zaporedja ponovitev HPLC, ki se uporabijo za preverjanje ustreznosti sistema HPLC pred analizo (referenčni kontrolni vzorci A), stabilnosti referenčnih kontrolnih vzorcev v daljšem časovnem obdobju (referenčni kontrolni vzorci B) ter tega, da topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije, ne vpliva na odstotno vrednost izgube peptidov (referenčni kontrolni vzorci C) (glej Dodatek 3). Z ustreznimi referenčnimi kontrolnimi vzorci za vsako kemikalijo se izračuna odstotna vrednost izgube peptidov za navedeno kemikalijo (glej odstavek 26). Poleg tega je treba v zaporedje ponovitev za vsako od analiziranih preskusnih kemikalij vključiti koelucijski kontrolni vzorec, sestavljen iz preskusne kemikalije same, da se zazna morebitna koelucija preskusne kemikalije s peptidom, sestavljenim iz lizina, ali peptidom, sestavljenim iz cisteina.

Inkubacija preskusne kemikalije z raztopinama peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina

Raztopino peptida, sestavljenega iz cisteina, je treba inkubirati v steklenih vialah za avtomatski vzorčevalnik s preskusno kemikalijo v razmerju 1: 10, raztopino peptida, sestavljenega iz lizina, pa v razmerju 1: 50. Če je takoj po tem, ko se v raztopino peptida doda raztopina preskusne kemikalije, vidna oborina, ki nastane zaradi slabe topnosti preskusne kemikalije v vodi, ne moremo biti prepričani o tem, koliko preskusne kemikalije je ostalo v raztopini za reagiranje s peptidom. Zato se lahko v takem primeru še vedno uporabi pozitivni rezultat, negativni rezultat pa ni zanesljiv in ga je treba razlagati z ustrezno previdnostjo (glej tudi določbe v odstavku 11 za preskušanje kemikalij, ki do koncentracije 100 mM niso topne). Reakcijsko raztopino je treba pred izvedbo analize HPLC za 24 ur ± 2 uri pustiti v temi pri 25 ± 2,5 °C. Vsako preskusno kemikalijo je treba analizirati v treh ponovitvah za oba peptida. Vzorce je treba pred analizo HPLC vizualno pregledati. Če se opazi oborina ali ločitev faz, se lahko vzorci centrifugirajo pri nizki hitrosti (100–400 x g), da se oborina izloči na dno viale kot previdnosti ukrep, saj lahko velike količine oborine zamašijo cevi ali kolone za HPLC. Če je oborina ali ločitev faz vidna po obdobju inkubacije, je vrednost izgubljanja peptidov morda podcenjena in v primeru negativnega rezultata ni mogoče dovolj zanesljivo sklepati o pomanjkanju reaktivnosti.

▼M7

Priprava standardne umeritvene krivulje za HPLC

Za peptide, sestavljene iz cisteina in lizina, je treba izdelati standardno umeritveno krivuljo. Standardno raztopino peptida je treba pripraviti v 20- ali 25-odstotni raztopini acetonitrila in pufra, pri čemer se za peptid, sestavljen iz cisteina, uporabi fosfatni pufer (z vrednostjo pH 7,5), za peptid, sestavljen iz lizina, pa pufer amonijevega acetata (z vrednostjo pH 10,2). Pripraviti je treba 6 raztopin za umerjanje, da se vanje zajame razpon od 0,534 do 0,0167 mM, pri čemer se uporabijo standardi za serije razredčitev osnovne raztopine peptida (0,667 mM). V standardno umeritveno krivuljo je treba vključiti tudi prazen vzorec s pufrom za redčenje. Ustrezne umeritvene krivulje morajo imeti $r^2 > 0,99$.

Priprava in analiza HPLC

Pred izvedbo analize je treba preveriti ustreznost sistema HPLC. Izguba peptidov se nadzoruje s HPLC, ki je povezana z UV-detektorjem (detektor s serijo fotodiod ali detektor absorbance s fiksno valovno dolžino s signalom 220 nm). V sistem HPLC se vstavi ustrezna kolona. V sistemu HPLC, opisanem v validiranem protokolu, je najbolj priporočljiva uporaba kolone Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 mikrona. Celotni sistem s kolono za HPLC z reverzno fazo je treba vsaj 2 uri pred izvedbo uravnotežiti pri 30 °C s 50 % faze A (0,1 vol. % trifluorocetne kisline v vodi) in 50 % faze B (0,085 vol. % trifluorocetne kisline v acetonitrilu). Analizo HPLC je treba izvesti s pretokom 0,35 ml/min in linearnim gradientom od 10 % do 25 % acetonitrila v 10 minutah, čemur sledi hitro povečanje na 90 % acetonitrila, da se odstranijo ostali materiali. Vbrizgati je treba enake volumne standardne raztopine, vzorca in kontrolnega vzorca. Kolono je treba med vbrizgavanji 7 minut ponovno uravnoteževati v začetnih pogojih. Če se uporabi druga kolona HPLC z reverzno fazo, je treba prilagoditi opisane parametre sistema, da se zagotovi ustrezno eluiranje in združevanje peptidov, sestavljenih iz cisteina in lizina, vključno z injekcijskim volumnom, ki se lahko spreminja glede na uporabljeni sistem (običajno v razponu 3 do 10 µl). Pomembno je, da se v primeru uporabe drugega sistema HPLC prikaže, da je enakovreden opisanemu validiranemu sistemu (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2). Absorbanca se nadzoruje pri 220 nm. Če se uporablja detektor s serijo fotodiod, je treba zabeležiti tudi absorbanco pri 258 nm. Opozoriti je treba, da imajo lahko nekatere pošiljke acetonitrila negativen učinek na stabilnost peptidov, kar je treba oceniti, ko se uporabi nova serija acetonitrila. Kot kazalnik koelucije se lahko uporabi razmerje med površinama vrha pri 220 in 258. Za vsak vzorec je razmerje v razponu 90 % < srednja ([1]) vrednost razmerja kontrolnih vzorcev < 100 % dober znak, da ni prišlo do koelucije.

Obstajajo preskusne kemikalije, ki lahko spodbujajo oksidacijo peptidov, sestavljenih iz cisteina. Vrh dimeriziranih peptidov, sestavljenih iz cisteina, se lahko vizualno nadzoruje. Če se pojavi dimerizacija, je treba to zabeležiti, saj se lahko odstotna vrednost izgube peptidov preceni, kar povzroči lažno pozitivne napovedi in/ali razvrstitev v višji razred reaktivnosti (glej odstavka 29 in 30).

Analizo HPLC za peptide, sestavljene iz cisteina in lizina, se lahko izvede na isti (če sta na voljo dva sistema HPLC) ali na drug dan. Če se analiza ne izvede na isti dan, je treba vsak dan sveže pripraviti vse raztopine preskusnih kemikalij za oba preskusa. Pri analizi je treba meriti čas, da se zagotovi, da se vbrizgavanje prvega vzorca začne 22 do 26 ur po tem, ko je bila preskusna kemikalija zmešana z raztopino peptidov. Določiti je treba zaporedje ponovitev HPLC, da

([1]) Srednja vrednost v celotnem dokumentu pomeni aritmetično sredino.

▼M7

analiza HPLC ne traja dlje kot 30 ur. Pri sistemu HPLC, uporabljenem v tej validacijski študiji in opisanem v tej preskusni metodi, je mogoče v eno samo ponovitev HPLC vključiti do 26 vzorcev analize (glej tudi odstavek 17). Primer zaporedja analize HPLC je naveden v Dodatku 3.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Koncentracija peptidov, sestavljenih iz cisteina ali lizina, se v vsakem vzorcu fotometrično določi pri 220 nm tako, da se izmeri površina vrha (površina pod krivuljo – PPK) ustreznih vrhov in izračuna koncentracija peptidov z uporabo linearne umeritvene krivulje, izpeljane iz standardnih raztopin.

Odstotna vrednost izgube peptidov se v vsakem vzorcu določi tako, da se izmeri površina vrha, ki se nato deli s srednjo vrednostjo površine vrha ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcev C (glej Dodatek 3) v skladu s formulo, navedeno v nadaljevanju.

$$\textit{Odstotna vrednost izgube peptidov} = \left[1 - \left(\frac{\textit{površina vrha peptida pri ponovnem vbrizganju}}{\textit{srednja vrednost površine vrha peptida v ref .kontrolah C}}\right)\right] \times 100$$

Merila za sprejemljivost

Da se ponovitev šteje za veljavno, morajo biti izpolnjena naslednja merila:

a) ustrezne umeritvene krivulje imajo $r^2 > 0{,}99$;

b) srednja odstotna vrednost izgube peptidov za tri ponovljene pozitivne kontrolne vzorce s cimetovim aldehidom se mora za peptide, sestavljene iz cisteina, gibati v razponu od 60,8 % do 100 %, za peptide, sestavljene iz lizina, pa v razponu od 40,2 % do 69,0 %, pri čemer je najvišji standardni odklon (SO) za ponovljene pozitivne kontrolne vzorce < 14,9 % za odstotek izgube cisteina in < 11,6 % za odstotek izgube lizina;

c) srednja vrednost koncentracije referenčnih kontrolnih vzorcev A mora znašati 0,50 ± 0,05 mM, koeficient variacije (KV) površine vrha peptidov za devet referenčnih kontrolnih vzorcev B in C v acetonitrilu pa < 15,0 %.

Če eno ali več teh meril ni izpolnjenih, je treba ponovitev izvesti še enkrat.

Da se rezultati preskusne kemikalije štejejo za veljavne, morajo biti izpolnjena naslednja merila:

a) najvišji standardni odklon za ponovljene vzorce preskusne kemikalije mora biti < 14,9 % za odstotek izgube cisteina in < 11,6 % za odstotek izgube lizina;

b) srednja vrednost koncentracije peptidov treh referenčnih kontrolnih vzorcev C v ustreznem topilu mora biti 0,50 ± 0,05 mM. Če ta merila niso izpolnjena, je treba podatke zavrniti in ponovitev za navedeno posebno preskusno kemikalijo izvesti še enkrat.

Napovedni model

Za vsako preskusno kemikalijo se izračuna srednja odstotna vrednost izgube cisteina in lizina. Negativa izguba se pri izračunu srednje vrednosti šteje kot „0“. Če se uporablja napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein in v razmerju 1: 50 za lizin iz preglednice 1, je treba v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v okviru IATA uporabiti prag v višini 6,38 % srednje izgube peptidov. Uporaba napovednega modela za razvrstitev preskusne kemikalije v enega od razredov reaktivnosti (tj. nizka, zmerna in visoka reaktivnost) se lahko včasih izkaže za uporabno pri oblikovanju ocene moči v okviru IATA.

▼M7

Preglednica 1

Napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein/ 1: 50 za lizin (1)

Srednja odstotna vrednost izgube cisteina in lizina	Razred reaktivnosti	Napoved DPRA (2)
0 % ≤ srednja odstotna vrednost izgube ≤ 6,38 %	brez reaktivnosti ali minimalna reaktivnost	negativna
6,38 % < srednja odstotna vrednost izgube ≤ 22,62 %	nizka reaktivnost	pozitivna
22,62 % < srednja odstotna vrednost izgube ≤ 42,47 %	zmerna reaktivnost	
42,47 % < srednja odstotna vrednost izgube ≤ 100 %	visoka reaktivnost	

(1) Podatki se nanašajo na statistično pridobljene mejne vrednosti in niso povezani z natančnostjo meritve.
(2) Napoved DPRA je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 12.

Lahko se pojavijo primeri, ko preskusna kemikalija (snov ali ena ali več sestavin snovi z več sestavinami ali zmesi) pri 220 nm močno absorbira in ima isti retencijski čas kot peptidi (koelucija). Koelucija se lahko odpravi z manjšo prilagoditvijo sistema HPLC, da se nadalje loči elucijski čas preskusne kemikalije in peptidov. Če se poskuša koelucija odpraviti z uporabo drugega sistema HPLC, je treba prikazati, da je enakovreden validiranemu sistemu (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2). Ko pride do koelucije, vrha peptidov ni mogoče vključiti in izračun odstotne vrednosti izgube peptidov ni mogoč. Če pride do koelucije takih preskusnih kemikalij s peptidi, sestavljenimi iz cisteina in lizina, je treba poročati, da je analiza „pomanjkljiva“. Če pride do koelucije le s peptidi, sestavljenimi iz lizina, se lahko uporabi napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein, o katerem se poroča v preglednici 2.

Preglednica 2

Napovedni model v razmerju 1: 10 za cistein (1)

Odstotna vrednost izgube cisteina	Razred reaktivnosti	Napoved DPRA (2)
0 % ≤ odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 13,89 %	brez reaktivnosti ali minimalna reaktivnost	negativna
13,89 % < odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 23,09 %	nizka reaktivnost	pozitivna
23,09 % < odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 98,24 %	zmerna reaktivnost	
98,24 % < odstotna vrednost izgube cisteina ≤ 100 %	visoka reaktivnost	

(1) Podatki se nanašajo na statistično pridobljene mejne vrednosti in niso povezani z natančnostjo meritve.
(2) Napoved DPRA je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 12.

Obstajajo lahko tudi drugi primeri, pri katerih prihaja do prekrivanja retencijskega časa med preskusno kemikalijo in je kateri koli od peptidov nepopoln. V takih primerih se lahko odstotne vrednosti izgube peptidov ocenijo in uporabijo v napovednem modelu, pri katerem je cistein v razmerju 1: 10, lizin pa v razmerju 1: 50, vendar preskusne kemikalije ni mogoče natančno razvrstiti v enega od razredov reaktivnosti.

▼M7

Kadar je rezultat nedvoumen, za preskusno kemikalijo zadostuje ena sama analiza HPLC za peptide, sestavljene iz cisteina in lizina. Kadar pa so rezultati blizu mejne vrednosti, ki se uporablja za razlikovanje med pozitivnimi in negativnimi rezultati (tj. so rezultati mejni), je potrebno dodatno preskušanje. V primerih, ko se srednja odstotna vrednost izgube pri napovednem modelu, pri katerem je cistein v razmerju 1: 10, lizin pa v razmerju 1: 50, giblje v razponu od 3 % do 10 % ali se odstotne vrednosti izgube cisteina pri modelu za napovedovanje, pri katerem je cistein v razmerju 1: 10, gibljejo v razponu od 9 % do 17 %, je treba razmisliti o drugi ponovitvi, v primeru neskladnih rezultatov med prvima dvema ponovitvama pa tudi o tretji.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija

— Snov iz ene sestavine:

  — kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

  — fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

  — čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

  — obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

  — preskušene koncentracije;

  — pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

  — čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

  — fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

  — molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;

  — obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

  — preskušene koncentracije;

  — pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Kontrole

— Pozitivna kontrola:

  — kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

  — fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

  — čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

▼M7

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

— Topilo/vehikel:

— uporabljeno topilo/vehikel in razmerja sestavin, če so na voljo;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni pri tej preskusni metodi, in če so na voljo;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo;

— za acetonitril – rezultati testa učinka na stabilnost peptida.

Priprava peptidov, pozitivne kontrole in preskusne kemikalije:

— opredelitev značilnosti raztopine peptidov (dobavitelj, serija, natančna teža peptidov, volumen, ki se doda za osnovno raztopino);

— opredelitev značilnosti pozitivne kontrole (natančna teža snovi za pozitivno kontrolo, volumen, ki se doda za preskusno raztopino);

— opredelitev značilnosti raztopin s preskusno kemikalijo (natančna teža preskusne kemikalije, volumen, ki se doda za preskusno raztopino).

Nastavitve in analiza instrumenta za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

— vrsta instrumenta za HPLC, kolone za HPLC in predkolone, detektor, avtomatski vzorčevalnik;

— parametri, ki so pomembni za analizo HPLC, kot so temperatura kolone, injekcijski volumen, pretok in gradient.

Ustreznost sistema:

— površina vrha peptida pri 220 nm v vsaki standardni raztopini in ponovljenem referenčnem kontrolnem vzorcu A;

— grafično prikazana linearna umeritvena krivulja in vrednost r^2, o kateri se je poročalo;

— koncentracija peptida v vsakem ponovljenem referenčnem kontrolnem vzorcu A;

— srednja vrednost koncentracije (v mM) peptida v treh referenčnih kontrolnih vzorcih A, SD in CV;

— koncentracija peptida v referenčnih kontrolnih vzorcih A in C.

▼M7

Potek analize:

— za referenčne kontrolne vzorce:

  — površina vrha peptida pri 220 nm v vsakem ponovljenem kontrolnem vzorcu B in C;

  — srednja vrednost površine vrha peptida pri 220 nm v devetih referenčnih kontrolnih vzorcih B in C v acetonitrilu, SD in CV (za stabilnost referenčnih kontrolnih vzorcev med trajanjem analize);

  — za vsako uporabljeno topilo: srednja vrednost površine vrha peptida pri 220 nm v treh ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcih C (za izračun odstotne vrednosti izgube peptidov);

  — za vsako uporabljeno topilo: koncentracija peptida (v mM) v treh ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcih C;

  — za vsako uporabljeno topilo: srednja vrednost koncentracije peptida (v mM) v treh ustreznih referenčnih kontrolnih vzorcih C, SD in CV;

— za pozitivni kontrolni vzorec:

  — površina vrha peptida pri 220 nm za vsak ponovljeni vzorec;

  — odstotna vrednost izgube peptidov za vsak ponovljeni vzorec;

  — srednja odstotna vrednost izgube peptidov za tri ponovljene vzorce, SD in CV;

— za vsako preskusno kemikalijo:

  — videz oborine v reakcijski zmesi ob koncu časa inkubacije, če je opažena ter navedba o tem, ali se je oborina ponovno raztopila ali centrifugirala;

  — prisotnost koelucije;

  — opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno;

  — površina vrha peptida pri 220 nm za vsak ponovljeni vzorec;

  — odstotna vrednost izgube peptidov za vsak ponovljeni vzorec;

  — srednja odstotna vrednost izgube peptidov v treh ponovljenih vzorcih, SD in CV;

  — srednje odstotne vrednosti izgube cisteina in lizina;

  — uporabljeni napovedni model in napoved DPRA.

Preskušanje usposobljenosti:

— če je ustrezno, postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

Razprava o rezultatih:

— razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusno metodo DPRA;

— razprava o rezultatih preskusne metode v okviru IATA, če so na voljo drugi pomembni podatki.

Sklepne ugotovitve

▼M7

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS): peta prenovljena izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment št. 168, OECD, Pariz.

(3) Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.

(4) Poglavje B.42 te priloge: Lokalna analiza bezgavk.

(5) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.

(6) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: BrdU-ELISA.

(7) Adler idr. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85: 367–485.

(8) Gerberick idr. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81: 332–343.

(9) Gerberick idr. (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97: 417–427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra.

(11) Jaworska idr. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, spletna različica, 14. maj 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch idr. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: str. 489–504.

(13) Nukada idr. (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27: 609–618.

(14) Gerberick idr. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60: 389–400.

(15) Landsteiner in Jacobs. (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64: 625–639.

(16) Dupuis in Benezra. (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin idr. (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report, str. 74. Na voljo na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra.

▼**M7**

(19) Natsch idr. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, spletna različica, 9. april 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing, str. 17. Na voljo na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, št. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Pariz, Francija.

(22) FDA (Food and Drug Administration) (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation str. 22. Na voljo na: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138.

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (21).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (2).

Umeritvena krivulja: razmerje med vrednostjo odziva med preskusom in analitsko koncentracijo (imenovana tudi *standardna krivulja*) znane snovi.

Kemikalija: snov ali zmes.

Koeficient variacije: merilo variabilnosti, ki se za skupino podatkov za ponovljene vzorce izračuna tako, da se standardni odklon deli s srednjo vrednostjo. Lahko se pomnoži s 100, da se izrazi v odstotkih.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki ob izpostavljenosti temu sredstvu lahko povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

Začetni dogodek na molekulski ravni: kemijsko povzročena sprememba biološkega sistema na molekulski ravni, ki se v poteku neželenega izida opredeli kot začetni dogodek.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (1).

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo $\geq$ 10 mas. % in $<$ 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Referenčna kontrola: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi

▼M7

izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (21).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (21).

Obnovljivost: ujemanje rezultatov, pridobljenih s preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej zanesljivost) (21).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (21).

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. To je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode. (21).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (1).

Ustreznost sistema: določitev učinkovitosti delovanja instrumenta (npr. občutljivost) z analizo referenčnega standarda pred izvedbo analitske serije (22).

Preskusna kemikalija: pojem „preskusna kemikalija“ se uporablja za opisovanje tega, kar se preskuša.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljavna preskusna metoda: preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (21).

▼M7

Dodatek 2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Preobčutljivost kože *in chemico*: neposredni preskus reaktivnosti peptidov (DPRA)

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pri preskusu DPRA pridobijo pravilne rezultate napovedi, pričakovane za 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so priporočene v preglednici 1, ter da pri vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti pridobijo vrednosti izgube cisteina oziroma lizina v ustreznem referenčnem območju za vsak peptid. Te snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro* za preskus DPRA ter uporaba v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM za prikaz uspešne izvedbe preskusne metode v laboratorijih, ki sodelujejo v študiji.

Preglednica 1

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za neposredni preskus reaktivnosti peptidov

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved *in vivo* [1]	Napoved DPRA [2]	Razpon [3] odstotne vrednosti izgube peptida, sestavljenega iz cisteina	Razpon [3] odstotne vrednosti izgube peptida, sestavljenega iz lizina
2,4-dinitroklorobenzen	97-00-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močan)	pozitivna	90–100	15–45
oksazolon	15646-46-5	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močan)	pozitivna	60–80	10–55
formaldehid	50-00-0	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (močan)	pozitivna	30–60	0–24
benzilidenaceton	122-57-6	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	80–100	0–7
farnezal	19317-11-4	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	15–55	0–25
2,3-butandion	431-03-8	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	60–100	10–45
1-butanol	71-36-3	tekočina	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5
6-metilkumarin	92-48-8	trdna snov	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5
4-metoksiacetofenon	100-06-1	trdna snov	snov, ki ni povzročitelj preobčutljivosti	negativna	0–7	0–5,5

([1]) Napovedi nevarnosti (in moči) *in vivo* temeljijo na podatkih za preskus LLNA (19). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (23).
([2]) Napoved preskusa DPRA je treba proučiti v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 9 in 11.
([3]) Razponi, določeni na podlagi vsaj 10 vrednosti izgube, ki jih je pridobilo 6 neodvisnih laboratorijev.

▼M7

Dodatek 3

PRIMERI POTEKA ANALIZE

Standardi za umerjanje in referenčni kontrolni vzorci	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 pufer za redčenje referenčni kontrolni vzorec A, 1. ponov. referenčni kontrolni vzorec A, 2. ponov. referenčni kontrolni vzorec A, 3. ponov.
Koelucijski kontrolni vzorci	koelucijski kontrolni vzorec 1 za 1. preskusno kemikalijo koelucijski kontrolni vzorec 2 za 2. preskusno kemikalijo
Referenčni kontrolni vzorci	referenčni kontrolni vzorec B, 1. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 2. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 3. ponov.
Prvi sklop ponovljenih vzorcev	referenčni kontrolni vzorec C, 1. ponov. cimetov aldehid, 1. ponov. vzorec 1, 1. ponov. vzorec 2, 1. ponov.
Drugi sklop ponovljenih vzorcev	referenčni kontrolni vzorec C, 2. ponov. cimetov aldehid, 2. ponov. vzorec 1, 2. ponov. vzorec 2, 2. ponov.
Tretji sklop ponovljenih vzorcev	referenčni kontrolni vzorec C, 3. ponov. cimetov aldehid, 3. ponov. vzorec 1, 3. ponov. vzorec 2, 3. ponov.
Referenčni kontrolni vzorci	referenčni kontrolni vzorec B, 4. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 5. ponov. referenčni kontrolni vzorec B, 6. ponov.

V analizo zaporedja je treba vključiti tri sklope referenčnih kontrolnih vzorcev (tj. vzorcev, sestavljenih le iz peptida, raztopljenega v ustreznem topilu):
Referenčni kontrolni vzorec A: se uporablja za preverjanje ustreznosti sistema HPLC.
Referenčni kontrolni vzorec B: je vključen na začetku in koncu analize zaporedja, da se preveri stabilnost referenčnih kontrolnih vzorcev prek celotnega trajanja analize.
Referenčni kontrolni vzorec C: je vključen v potek analize, da se preveri, da topilo, ki se uporablja za raztapljanje preskusne kemikalije, ne vpliva na odstotno vrednost izgube peptidov.

▼M7

B.60 **PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: LUCIFERAZNA PRESKUSNA METODA Z ARE-NRF2**

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 442D (2015). Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]). Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in vitro* (luciferazni preskus z ARE-Nrf2) v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN (1) in uredbo CLP.

Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Obstoječe znanje o kemijskih in bioloških mehanizmih, povezanih s preobčutljivostjo kože, je povzeto v obliki poteka neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2) od začetnega dogodka na molekulski ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa pri ljudeh ali kontaktne preobčutljivosti pri glodalcih (2) (3). Začetni dogodek na molekulski ravni je kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože. Drugi ključni dogodek v tem poteku neželenega izida se odvija v keratinocitih in vključuje vnetni odziv ter izražanje genov, povezano s posebnimi potmi celičnega signaliziranja, kot so poti, odvisne od odzivnega elementa za antioksidante/elektrofile (ARE). Tretji ključni dogodek je aktivacija dendritskih celic, ki se običajno ocenjujejo z izražanjem posebnih označevalcev celične površine, tj. kemokinov in citokinov. Četrti ključni dogodek je proliferacija celic T, kar se posredno ocenjuje pri lokalni analizi bezgavk pri miših (4).

Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, ki temelji na morskih prašičkih, tj. Magnusson–Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GMPT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (5)), se proučuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitacije. Lokalna analiza bezgavk pri miših (Local Lymph Node Assay – LLNA, PM B.42 (4)) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (6)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (7)), ki vse ocenjujejo le indukcijski odziv, so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi pa morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.

Pred kratkim pa sta se kot znanstveno veljavni za ocenjevanje nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože začeli šteti preskusni metodi *in chemico* ter *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih. Da bi bilo mogoče v celoti nadomestiti testiranja na živalih, ki se trenutno uporabljajo, pa bodo potrebne kombinacije metod, ki se ne izvajajo na živalih (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), pri čemer se upošteva omejeno mehanistično kritje poteka neželenega izida pri vsaki od trenutno razpoložljivih preskusnih metod, ki se ne izvajajo na živalih (2) (3).

Predlagano je, da bi ta preskusna metoda (luciferazni preskus z ARE-Nrf2) obravnavala drugi ključni dogodek, pojasnjen v odstavku 2. Poročalo se je, da povzročitelji preobčutljivosti kože povzročajo nastanek genov, ki jih urejajo odzivni elementi za antioksidante (ARE) (8) (9). Majhne elektrofilne snovi, kot so povzročitelji preobčutljivosti kože, lahko delujejo kot senzorska beljakovina Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), npr. s kovalentno spremembo ostanka cisteina, zaradi česar se disociira od transkripcijskega dejavnika Nrf2

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M7

(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 – jedrni dejavnik, povezan z eritroidom 2). Ta disociirani dejavnik Nrf2 lahko nato aktivira gene, odvisne od odzivnih elementov za antioksidante, kot so geni, ki kodirajo razstrupljevalne encime v fazi II (8) (10) (11).

Trenutno je edini luciferazni preskus z ARE-Nrf2 *in vitro*, ki ga zajema ta preskusna metoda, preskus KeratinoSens™, za katerega so bile izvedene validacijske študije (9) (12) (13), ki jim je sledil neodvisni medsebojni strokovni pregled, ki ga je izvedel Referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) (14). Preskus KeratinoSens™ se je štel kot znanstveno veljaven za uporabo v okviru IATA v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje (14). Laboratoriji, ki so preskusno metodo pripravljeni izvajati, lahko rekombinantno celično linijo, ki se uporablja v preskus KeratinoSens™, dobijo s sklenitvijo licenčne pogodbe z razvijalcem preskusne metode (15).

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI, UPORABNOST IN OMEJITVE

Ker aktivacija poti Keap1-Nrf2-ARE obravnava le drugi ključni dogodek poteka neželenega izida preobčutljivosti kože, informacije iz preskusnih metod, ki temeljijo na aktivaciji te poti, kot take morda ne zadostujejo za sklep o potencialu kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato je treba podatke, pridobljene s to preskusno metodo, obravnavati v okviru celostnih pristopov, kot je IATA, in jih združiti z drugimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki poteka neželenega izida preobčutljivosti kože, ter nepreskusnimi metodami, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh V virih poročajo o tem, kako uporabljati luciferazno preskusno metodo z ARE-Nrf2 v kombinaciji z drugimi informacijami (13) (16) (17) (18) (19).

Ta preskusna metoda se lahko uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v okviru IATA. Te preskusne metode ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitiven rezultat kot tak mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

Na podlagi zbirke podatkov iz validacijske študije in preskušanja v laboratoriju, ki se uporablja pri neodvisnem medsebojnem strokovnem pregledu preskusne metode, se je pokazalo, da se lahko preskus KeratinoSens™ prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje na področju celičnih kultur. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusni metodi, je v enem in več laboratorijih 85-odstotna (14). V primerjavi z rezultati analize LLNA so bile točnost (77 % – 155/201), občutljivost (78 % – 71/91) in specifičnost (76 % – 84/110) preskusa KeratinoSens™ za razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože (npr. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, izračunane ob upoštevanju vseh podatkov, poslanih EURL ECVAM za oceno in medsebojni strokovni pregled preskusne metode (14). Ti podatki so podobni nedavno objavljenim podatkom, ki temeljijo na preskušanju približno 145 snovi v laboratoriju (pri čemer je točnost 77-odstotna, občutljivost 79-odstotna in specifičnost 72-odstotna) (13). Pri preskusu KeratinoSens™ je bolj verjetno, da se podceni vrednost kemikalij z nizko do

▼M7

zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pa kemikalij z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (13) (14). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus KeratinoSens™ uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus KeratinoSens™ kot samostojno preskusno metodo zgolj okvirne, saj jo je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA in v skladu z določbami odstavka 9. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih razmer v proučevani vrsti, tj. pri človeku, ne izražajo v celoti.

Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo luciferazne preskusne metode z ARE-Nrf2 za preskušanje snovi in/ali zmesi. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus KeratinoSens™ lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (9) (12) (13) (14). V glavnem so bile preskušene snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja omejena količina podatkov o preskušanju zmesi (20). Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, pa je treba proučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Poleg tega je treba pri preskušanju snovi z več sestavinami ali zmesi upoštevati morebitno interferenco citotoksičnih sestavin z opaženimi odzivi. Preskusna metoda se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila v različne faze), in sicer v vodi ali DMSO (vključno z vsemi sestavinami preskusne kemikalije v primeru preskušanja snovi z več sestavinami ali zmesi). Preskusne kemikalije, ki ne izpolnjujejo teh pogojev pri najvišji končni zahtevani koncentraciji v višini 2 000 μM (prim. odstavek 22), se lahko še vedno preskusijo pri nižjih koncentracijah. V takem primeru se lahko za opredelitev preskusne kemikalije kot povzročiteljice preobčutljivosti kože še vedno uporabijo rezultati, ki izpolnjujejo merila za pozitivnost, opisana v odstavku 39, medtem ko je treba negativni rezultat, pridobljen pri koncentracijah, manjših od 1 000 μM, obravnavati kot nedokončen (glej napovedni model v odstavku 39). V splošnem so bile uspešno preskušene snovi z logP do 5, medtem ko so bile izredno hidrofobne snovi z logP nad 7 zunaj znane uporabnosti preskusne metode (14). Za snovi, pri katerih se logP giblje v razponu od 5 do 7, so na voljo le omejeni podatki.

Negativne rezultate je treba razlagati previdno, saj se lahko s preskusno metodo odkrije, da so snovi, ki so reaktivne izključno z lizinskimi ostanki, negativne. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti uporabljene celične linije (21) ter preskusnih pogojev pri pro-haptenih (tj. kemikalijah, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450) in pre-haptenih (tj. kemikalijah, aktiviranih z avtooksidacijo), zlasti pri tistih s počasno oksidacijo, pojavijo negativni rezultati. Po drugi strani pa se lahko pri preskusnih kemikalijah, ki ne delujejo kot povzročitelji preobčutljivosti, temveč so vseeno kemični stresorji, pojavijo lažno pozitivni rezultati (14). Močno citotoksičnih preskusnih kemikalij prav tako ni mogoče vedno zanesljivo oceniti. Preskusne kemikalije, ki motijo luciferazne encime, lahko motijo dejavnost luciferaze v preskusih na osnovi celic in povzročajo bodisi očitno zaviranje bodisi povečano luminiscenco (22). Poročalo se je na primer o tem, da koncentracije fitoestrogena, višje od 1 μM, motijo

▼M7

luminiscenčne signale v drugih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena (23). Izražanje luciferaze, pridobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih kemikalij, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, je treba pazljivo proučiti (23). Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti.

Poleg tega, da preskus KeratinoSens™ podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zagotavlja tudi podatke o razmerju med koncentracijo in odzivom, ki lahko potencialno prispevajo k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti, kadar se uporabljajo v celostnih pristopih, kot je IATA (19). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na zanesljivih podatkih za ljudi, da se določi, kako bi rezultati preskusa KeratinoSens™ lahko prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti (24) in razvrstitvi povzročiteljev preobčutljivosti v podkategorije po GHS ZN/uredbi CLP.

NAČELO PRESKUSA

Pri luciferazni preskusni metodi z ARE-Nrf2 se uporabljajo nesmrtna celična linija, pridobljena iz človeških keratinocitov HaCaT, ki so predmet stabilne transfekcije z izbirnim plazmidom. Celična linija vsebuje luciferazni gen, ki je pod transkripcijsko kontrolo konstitutivnega promotorja, združenega z elementom ARE, iz gena, za katerega je znano, da ga povzročitelji preobčutljivosti kože regulirajo navzgor (25) (26). Iz luciferaznega signala je razvidno, da so ga aktivirali povzročitelji preobčutljivosti endogenih od dejavnika Nrf2 odvisnih genov in da je odvisen od luciferaznega signala v rekombinantni celični liniji na dejavniku Nrf2 (27). To omogoča kvantitativno merjenje (z zaznavanjem luminiscence) indukcije luciferaznega gena, pri čemer se kot kazalniki dejavnosti transkripcijskega dejavnika Nrf2 v celicah, po tem ko so izpostavljene elektrofilnim snovem, uporabijo dobro vzpostavljeni luciferazni substrati, ki oddajajo svetlobo.

Šteje se, da so preskusne kemikalije pri preskusu KeratinoSens™ pozitivne, če povzročajo statistično značilno indukcijo luciferazne dejavnosti nad danim pragovno vrednostjo (tj. > 1,5 krat ali 50-odstotno povečanje), pod opredeljeno koncentracijo, ki ne vpliva bistveno na viabilnost celic (tj. pod 1 000 μM in pri koncentraciji, pri kateri je viabilnost celic višja od 70 % (9) (12)). Zato se določi najvišje razmerje indukcije luciferazne dejavnosti v kontroli s topilom (negativni kontroli) (I_{max}). Ker so celice izpostavljene seriji koncentracij preskusnih kemikalij, je treba koncentracijo, potrebno za statistično značilno indukcijo luciferazne dejavnosti nad pragovno vrednostjo (tj. vrednostjo $EC_{1,5}$), interpolirati iz krivulje odziva na odmerek (za izračune glej odstavek 32). Nazadnje je treba opraviti vzporedne meritve citotoksičnosti, da se oceni, ali se ravni indukcije luciferazne dejavnosti pojavijo pri subcitotoksičnih koncentracijah.

Pred redno uporabo luciferaznega preskusa z ARE-Nrf2, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.

Standardi izvajanja (SI) (28), ki so na voljo, omogočajo poenostavitev validacije novih ali prilagojenih luciferaznih preskusnih metod z ARE-Nrf2 *in vitro*, ki so podobne preskusu KeratinoSens™, ter pravočasno spremembo te preskusne metode za njihovo vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov v skladu s sporazumom OECD bo zagotovljeno le za preskusne metode, validirane v skladu z SI, če je te preskusne metode pregledala OECD in jih vključila v ustrezno preskusno smernico.

▼M7

POSTOPEK

Trenutno je edina metoda, ki jo zajema ta preskusna metoda, znanstveno veljavni preskus KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Na voljo so standardni delovni postopki za preskus KeratinoSens™, ki jih je treba uporabljati pri izvajanju in uporabi preskusne metode v laboratoriju (15). Laboratoriji, ki želijo izvajati to preskusno metodo, lahko rekombinantno celično linijo, ki se uporablja pri preskusu KeratinoSens™, dobijo s sklenitvijo licenčne pogodbe z razvijalcem preskusne metode. V naslednjih odstavkih so opisani glavne sestavine in postopki luciferazne preskusne metode z ARE-Nrf2.

Priprava keratinocitnih kultur

Uporabiti je treba transgensko celično linijo s stabilno vstavitvijo luciferaznega poročevalskega gena pod kontrolo elementa ARE (npr. celično linijo KeratinoSens™). Celice se po prejemu namnožijo (npr. 2 do 4 pasaže) in shranijo zamrznjene kot homogena zaloga. Celice iz originalne zaloge se lahko namnožijo do največjega števila pasaž (npr. 25 v primeru KeratinoSens™) in se uporabijo pri rednem preskušanju z uporabo ustreznega vzdrževalnega gojišča (v primeru KeratinoSens™ to pomeni DMEM, ki vsebuje serum in Geneticin).

Za preskušanje mora biti konfluenca celic 80–90-odstotna in zagotoviti je treba, da se celice nikoli ne gojijo do popolne konfluence. Celice je treba odvzeti en dan pred preskušanjem in razdeliti v 96-jamične mikrotitrske plošče (10 000 celic na jamico v primeru KeratinoSens™). Pozornost je treba posvetiti temu, da se med nasaditvijo izognemo sedimentaciji celic, tako da je število celic homogeno porazdeljeno med jamicami. V nasprotnem primeru lahko pri tem koraku nastane visoka variabilnost med posameznimi celicami. Pri vsaki ponovitvi se za meritev luciferazne dejavnosti uporabijo trije ponovljeni vzorci ter en vzporeden ponovljen vzorec za preskus viabilnosti celic.

Priprava preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za preskus KeratinoSens™ se preskusne kemikalije raztopijo v dimetil sulfoksidu (DMSO) do končne želene koncentracije (npr. 200 mM). Za raztopine DMSO se lahko šteje, da se same sterilizirajo, zato sterilna filtracija ni potrebna. Preskusna kemikalija, ki ni topna v DMSO, se raztopi v sterilni vodi ali gojišču, raztopine pa se sterilizirajo, npr. s filtracijo. Za preskusne kemikalije brez določene molekulske mase (MM) se pripravi osnovna raztopina do privzete koncentracije (40 mg/ml ali 4 % (m/v)) v preskusu KeratinoSens™. Če se uporabljajo druga topila kot DMSO, voda ali gojišče, jih je treba zadostno znanstveno utemeljiti.

Iz osnovnih raztopin preskusne kemikalije v DMSO se pripravijo zaporedne razredčitve, pri čemer se uporabi DMSO, da se pridobi 12 izhodiščnih koncentracij kemikalije, ki se preskuša (od 0,098 do 200 mM v preskusu KeratinoSens™). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v DMSO, se razredčine za pridobitev izhodiščnih koncentracij pripravijo s sterilno vodo ali sterilnim gojiščem. Izhodiščne koncentracije se neodvisno od uporabljenega topila nato nadalje 25-kratno razredčijo v gojišču, ki vsebuje serum, nazadnje pa končno uporabijo za tretiranje z nadaljnjim 4-kratnim faktorjem razredčenja, tako da se v preskusu KeratinoSens™ končne koncentracije preskušene kemikalije gibljejo v razponu od 0,98 do 2 000 μM. Če se uporabljajo druge koncentracije, jih je treba utemeljiti (npr. v primeru citotoksičnosti ali slabe topnosti).

Negativna kontrola (kontrola s topilom), uporabljena pri preskusu KeratinoSens™, je DMSO (št. CAS 67-68-5, s čistostjo ≥ 99 %) in zanjo se pripravi šest jamic na pladenj. Ta kontrola se razredči tako kot izhodiščne koncentracije, kar je opisano v odstavku 22, tako da je končna koncentracija negativne kontrole (kontrole s topilom), za katero je znano, da ne vpliva na viabilnost celic, ter ki ustreza enaki koncentraciji DMSO, najdeni v preskusni kemikaliji in pozitivni

▼M7

kontroli, enaka 1 %. Za preskusno kemikalijo, ki ni topna v DMSO, za katero so bile pripravljene razredčitve v vodi, je treba stopnjo DMSO v končni preskusni raztopini prilagoditi na 1 %, kot pri ostalih preskusnih kemikalijah in kontrolnih snoveh.

Pozitivna kontrola, uporabljena v primeru preskusa KeratinoSens™, je cimetov aldehid (št. CAS 14371-10-9, s čistostjo ≥ 98 %) in zanjo se pripravi sklop 5 izhodiščnih koncentracij, ki se gibljejo v razponu od 0,4 do 6,4 mM, v DMSO (iz 6,4 mM osnovne raztopine), ki se razredčijo, kot je za izhodiščne koncentracije opisano v odstavku 22, tako da se končna koncentracija pozitivne kontrole giblje v razponu od 4 do 64 μM. Če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za pridobitev primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev, se lahko uporabijo druge ustrezne pozitivne kontrole, s katerimi se po možnosti zagotavljajo vrednosti $EC_{1,5}$ v sredini območja.

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

Za vsako preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolno snov je potreben en poskus za izpeljavo napovedi (pozitivne ali negativne), ki mora biti sestavljen iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev, ki vsebujeta vsaka po tri ponovljene vzorce (tj. n = 6). Če rezultati dveh neodvisnih ponovitev niso skladni, je treba izvesti tretjo ponovitev, ki vsebuje tri ponovljene vzorce (tj. n = 9). Vsaka neodvisna ponovitev se izvede na drug dan s svežo osnovno raztopino preskusnih kemikalij in neodvisno odvzetimi celicami. Vendar lahko celice izhajajo iz iste pasaže.

Po nasaditvi, kot je opisano v odstavku 20, se celice gojijo 24 ur v 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah. Medij se nato odstrani in zamenja s svežim gojiščem (150 μl gojišča, ki vsebuje serum, vendar v primeru KeratinoSens™ brez Geneticina), v katerega se doda 50 μl 25-kratno razredčene preskusne kemikalije in kontrolnih snovi. Vsaj eno jamico na pladenj je treba pustiti prazno (brez celic in obdelave) zaradi ocene vrednosti v ozadju.

Obdelani pladnji se nato v preskusu KeratinoSens™ inkubirajo za približno 48 ur pri 37 ± 1 °C v prisotnosti 5 % CO_2. Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusno kemikalijo, npr. s prekrivanjem pladnjev s folijo pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami.

Meritve luciferazne dejavnosti

Pri zagotavljanju ustreznih odčitavanj luminiscence so ključni trije dejavniki:

— izbira občutljivega luminometra,

— izbira dovolj visokega pladnja, da se prepreči majhna navzkrižna kontaminacija s svetlobo, in

— uporaba substrata luciferaze z ustrezno izhodno svetlobo, da se zagotovi ustrezna občutljivost in majhna variabilnost.

Pred preskušanjem je treba izvesti poskusni kontrolni sistem, kot je opisano v Dodatku 3, s čimer se zagotovi, da so izpolnjene te tri točke.

Celice se po 48-urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji in kontrolnim snovem v preskusu KeratinoSens™ sperejo s fosfatnim pufrom s soljo, v vsako jamico pa se za 20 min pri sobni temperaturi doda ustrezni lizni pufer za odčitavanje luminiscence.

▼M7

Pladnji s celičnim lizatom se nato vstavijo v luminometer za odčitavanje, ki je v preskusu KeratinoSens™ programiran tako, da (i) se v vsako jamico doda luciferazni substrat (tj. 50 µl), (ii) počaka 1 sekundo in (iii) za 2 sekundi vključi luciferazna dejavnost. Če se uporabijo drugačne nastavitve, npr. glede na uporabljeni model luminometra, jih je treba utemeljiti. Poleg tega se lahko uporabi tudi substrat, ki oddaja svetlobo, če je poskus za nadzor kakovosti iz Dodatka 3 uspešno izveden.

Ocena citotoksičnosti

Pri preskusu viabilnosti celic KeratinoSens™ se medij po 48-urni izpostavljenosti zamenja s svežim medijem, ki vsebuje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid, tiazolil modro tetrazol bromid, št. CAS 298-93-1), celice pa se za 4 ure inkubirajo pri 37 °C v prisotnosti 5 % CO_2. Medij MTT se nato odstrani in celice se čez noč lizirajo (npr. z dodatkom 10-odstotne raztopine natrijevega dodecil sulfata (SDS) v vsako jamico). Po stresanju se s fotometrom izmeri absorpcija pri 600 nm.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

Pri preskusu KeratinoSens™ se izračunajo naslednji parametri:

— vrednost najvišjega povprečnega razmerja indukcije luciferazne dejavnosti (I_{max}), opažena pri kateri koli koncentraciji preskusne kemikalije in pozitivni kontroli;

— vrednost $EC_{1,5}$, ki pomeni koncentracijo, pri kateri indukcija luciferazne dejavnosti preseže 1,5-kratno pragovno vrednost (tj. se luciferazna dejavnost poveča za 50 %); ter

— vrednosti koncentracij IC_{50} in IC_{30} pri 50-odstotnem in 30-odstotnem zmanjšanju viabilnosti celic.

— Z enačbo 1 se izračuna razmerje indukcije luciferazne dejavnosti, skupno najvišje razmerje indukcije (I_{max}) pa se izračuna kot povprečje posameznih ponovitev.

Enačba 1:

$$razmerje\ indukcije = \frac{(L_{vzorec} - L_{prazno})}{(L_{topilo} - L_{prazno})}$$

pri čemer je:

L_{vzorec} odčitek luminiscence v jamici s preskusno kemikalijo;

L_{prazno} odčitek luminiscence v prazni jamici, ki ne vsebuje celic in ni obdelana;

L_{topilo} odčitek povprečne luminiscence v jamicah, ki vsebujejo celice in kontrolo s topilom (negativno kontrolo).

Vrednost $EC_{1,5}$ se v skladu z enačbo 2 izračuna z linearno interpolacijo, skupna vrednost $EC_{1,5}$ pa se izračuna kot geometrijska sredina posameznih ponovitev.

Enačba 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

pri čemer je:

C_a najnižja koncentracija v μM z razmerjem indukcije > 1,5;

C_b najvišja koncentracija v μM z razmerjem indukcije < 1,5;

I_a razmerje indukcije, izmerjeno pri najnižji koncentraciji z razmerjem indukcije > 1,5 (srednja vrednost treh jamic s ponovljenimi vzorci);

I_b razmerje indukcije, izmerjeno pri najvišji koncentraciji z razmerjem indukcije < 1,5 (srednja vrednost treh jamic s ponovljenimi vzorci).

Viabilnost se izračuna z enačbo 3:

Enačba 3:

$$Viabilnost = \frac{(V_{vzorec} - V_{prazno})}{V_{topilo} - V_{prazno}} \times 100$$

pri čemer je:

V_{vzorec} odčitek absorbance MTT v jamici s preskusno kemikalijo;

V_{prazno} odčitek absorbance MTT v prazni jamici, ki ne vsebuje celic in ni obdelana;

V_{topilo} odčitek povprečne absorbance MTT v jamicah, ki vsebujejo celice in kontrolo s topilom (negativno kontrolo).

Vrednosti IC_{50} in IC_{30} se izračunata z linearno interpolacijo v skladu z enačbo 4, skupni vrednosti IC_{50} in IC_{30} pa se izračunata kot geometrijska sredina posameznih ponovitev.

Enačba 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

pri čemer je:

X zmanjšanje koncentracije, ki jo je treba izračunati, v % (50 oz. 30 za IC_{50} oz. IC_{30});

C_a najnižja koncentracija v μM z zmanjšanjem viabilnosti > x %;

C_b najvišja koncentracija v μM z zmanjšanjem viabilnosti < x %;

V_a viabilnost v % pri najnižji koncentraciji z zmanjšanjem viabilnosti > x %;

V_b viabilnost v % pri najvišji koncentraciji z zmanjšanjem viabilnosti < x %.

Pri vsaki koncentraciji, pri kateri se pokaže razmerje indukcije luciferazne dejavnosti > 1,5, se izračuna statistična značilnost (npr. z dvodelnim Studentovim t-testom), pri čemer se primerjajo vrednosti luminiscence za tri ponovljene vzorce z vrednostmi luminiscence v jamicah s kontrolo s topilom (negativna kontrola), da se določi, ali je indukcija luciferazne dejavnosti statistično značilna ($p < 0,05$). Najnižja koncentracija z razmerjem indukcije luciferazne dejavnosti > 1,5 je vrednost, ki določa vrednost $EC_{1,5}$. V vsakem primeru se preveri, ali je ta vrednost nižja od vrednosti IC_{30}, kar pomeni manj kot 30-odstotno zmanjšanje viabilnosti celic pri koncentraciji, s katero se določa $EC_{1,5}$.

▼M7

Priporočeno je, da se podatki vizualno pregledajo z grafi. Če ni opaziti jasne krivulje odziva na odmerek ali če je krivulja odziva na odmerek bifazna (kar pomeni, da dvakrat prečka mejno vrednost 1,5), je treba poskus ponoviti, da se preveri, ali je to specifično za preskusno kemikalijo ali posledica poskusnega artefakta. Če je bifazni odziv mogoče ponoviti v neodvisnem poskusu, je treba poročati o nižji vrednosti $EC_{1,5}$ (koncentracija, pri kateri je mejna vrednost 1,5 presežena prvič).

V redkih primerih, ko je opaziti statistično neznačilno razmerje indukcije nad 1,5, ki ji sledi višja koncentracija s statistično značilno indukcijo, se rezultati iz te ponovitve štejejo kot veljavni in pozitivni le, če je bilo za necitotoksično koncentracijo pridobljeno statistično značilno razmerje indukcije nad pragovno vrednostjo 1,5.

Pri preskusnih kemikalijah, pri katerih se že pri najnižji preskusni koncentraciji, ki je 0,98 μM, ustvari razmerje indukcije v višini 1,5 ali več, se vrednost $EC_{1,5}$ < 0,98 določi na podlagi vizualnega pregleda krivulje odziva na odmerek.

Merila za sprejemljivost

Pri uporabi preskusa KeratinoSens™ morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost. Indukcija luciferazne dejavnosti, pridobljena s pozitivno kontrolo, tj. cimetovim aldehidom, mora v vsaj eni od preskušenih koncentracij (od 4 do 64 μM) statistično značilno presegati pragovno vrednost v višini 1,5 (npr. z uporabo t-preskusa).

Vrednost $EC_{1,5}$ mora biti znotraj dveh standardnih odklonov srednje vrednosti preskusnega laboratorija iz preteklih preskusov (tj. med 7 μM in 30 μM na podlagi validacijske zbirke podatkov), ki jo je treba redno posodabljati. Poleg tega se mora povprečna indukcija treh ponovljenih vzorcev s cimetovim aldehidom pri 64 μM gibati v razponu od 2 do 8. Če slednje merilo ni izpolnjeno, je treba pazljivo preveriti razmerje med odmerkom in odzivom cimetovega aldehida, preskusi pa so sprejemljivi le, če obstaja jasno razmerje med odmerkom in odzivom z naraščajočo indukcijo luciferazne dejavnosti pri večjih koncentracijah za pozitivno kontrolo.

Povprečni koeficient variacije odčitkov luminiscence za negativno kontrolo (kontrolo s topilom) v DMSO ne sme presegati 20 % pri vsaki ponovitvi, ki je sestavljena iz 6 jamic, preskušenih v treh ponovitvah. Če je variabilnost višja, je treba rezultate zavreči.

Razlaga rezultatov in napovedni model

Napoved KeratinoSens™ se obravnava kot pozitivna, če so izpolnjeni vsi naslednji štirje pogoji v dveh od dveh ponovitev ali v enakih dveh od treh ponovitev, v nasprotnem primeru se napoved KeratinoSens™ obravnava kot negativna (slika 1):

1. I_{max} je višja od (>) 1,5-kratne in statistično značilno drugačna kot pri kontrolnem vzorcu s topilom (negativni kontroli) (kot je ugotovljeno z dvostranskim, neparnim Studentovim t-testom);

2. viabilnost celic je višja od (>) 70 % pri najnižji koncentraciji z indukcijo dejavnosti luciferaze, ki presega 1,5-kratno (tj. pri koncentraciji za določanje $EC_{1,5}$);

3. vrednost $EC_{1,5}$ je manjša od (<) 1 000 μM (ali < 200 μg/ml za preskusne kemikalije brez opredeljene molekulske mase);

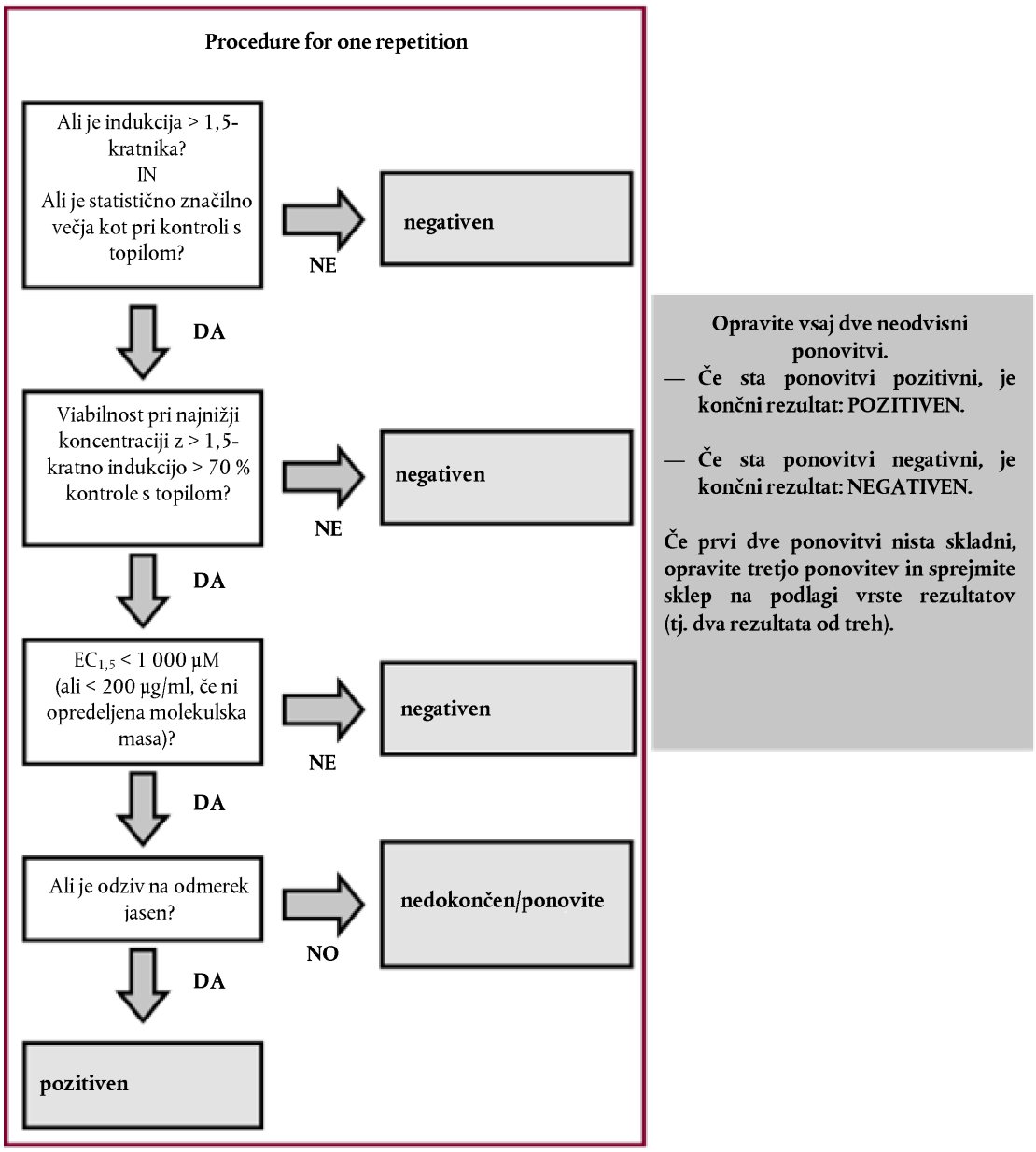
4. za indukcijo luciferaze obstaja očiten splošen odziv na odmerek (ali dvofazen odziv, kot je omenjeno v odstavku 33).

▼M7

Če so v dani ponovitvi izpolnjeni vsi prvi trije pogoji, ni pa mogoče ugotoviti jasnega odziva na odmerek za indukcijo luciferaze, je treba rezultat te ponovitve obravnavati kot nedokončen in morda bodo potrebni nadaljnji preskusi (slika 1). Poleg tega je treba kot nedokončnega obravnavati tudi negativen rezultat, pridobljen s koncentracijami < 1 000 µM (ali < 200 µg/ml za preskusne kemikalije brez opredeljene molekulske mase) (glej odstavek 11).

Slika 1

Napovedni model, uporabljen v preskus KeratinoSens™. Napoved KeratinoSens™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 11.



V redkih primerih so lahko preskusne kemikalije, ki povzročijo dejavnost luciferaze zelo blizu citotoksičnih ravni, pozitivne v nekaterih ponovitvah na necitotoksičnih ravneh (tj. koncentracija za določanje $EC_{1,5}$ je nižja od (<) IC_{30}), v drugih ponovitvah pa samo na citotoksičnih ravneh (tj. koncentracija za določanje $EC_{1,5}$ je višja od (>) IC_{30}). Take preskusne kemikalije je treba ponovno

▼M7

preskusiti z ožjo analizo odziva na odmerek, pri čemer se uporabi nižji faktor razredčenja (npr. 1,33- ali Ö2 (= 1,41)-kratno razredčenje med jamicami), da se ugotovi, ali je do indukcije prišlo na citotoksičnih ravneh ali ne (9).

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— snov iz ene sestavine:

  — kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

  — fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

  — čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

  — obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

  — preskušene koncentracije;

  — pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

  — čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

  — fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

  — molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;

  — obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

  — preskušene koncentracije;

  — pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Kontrole:

— pozitivna kontrola:

  — kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

  — fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;

  — čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

  — obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

  — preskušene koncentracije;

  — pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

▼M7

— sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno;

— negativna kontrola (z vehiklom):

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druge negativne kontrole/vehikli razen tistih, ki so navedeni pri tej preskusni metodi, in če so na voljo;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo.

Pogoji preskusne metode:

— ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;

— opis uporabljene preskusne metode;

— uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);

— število pasaž in stopnja konfluence celic, uporabljenih za preskušanje;

— metoda štetja celic, uporabljena za nasaditev pred preskušanjem, in ukrepi, sprejeti za zagotovitev homogene porazdelitve števila celic (glej tudi odstavek 20);

— uporabljeni luminometer (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, uporabljenim substratom luciferaze in prikazom ustreznih meritev luminiscence, ki temeljijo na kontrolnem preskusu, opisanem v Dodatku 3;

— postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

Preskusni postopek:

— uporabljeno število ponovitev in ponovljenih vzorcev;

— uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, postopek dodajanja in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

— Preglednice z vrednostmi I_{max}, $EC_{1.5}$ in vrednostmi viabilnosti (tj. IC_{50}, IC_{30}), ki so bile pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo za vsako ponovitev, ter srednje vrednosti (I_{max}: povprečje; $EC_{1.5}$ in vrednosti viabilnosti: geometrijska sredina) in standardni odklon (SD), izračunan na podlagi podatkov iz vseh posameznih ponovitev, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;

▼M7

— koeficient variacije, pridobljen z meritvami luminiscence za negativno kontrolo za vsak poskus;

— graf, ki prikazuje krivulje odziva na odmerek za indukcijo dejavnosti luciferaze in viabilnost;

— opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

— razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom KeratinoSens™;

— obravnavanje rezultatov preskusnih metod v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Pariz.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K. E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F. Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J. M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367–485.

(4) Poglavje B.42 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk.

(5) Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.

(6) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.

(7) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284–292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281–290.

(10) Dinkova-Kostova A. T., Holtzclaw W. D., Kensler T. W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779–1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S. M., Leinonen H., Levonen A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45–49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733–744.

(13) Natsch A., Ryan C. A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G. F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337–1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 str. Na voljo na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013). Protocol 155: KeratinoSens™., 17 str. Na voljo na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106–121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J. C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S. N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389–400.

(18) Bauch C., Kolle S. N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489–504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J. Appl. Toxicol. 33, 1353–1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V. M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220–1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683–1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646–657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Pariz.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L. A., Ryan C.A., Foertsch L. M., Kennedy J. M., Dearman R. J., Kimber I., Gerberick G. F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813–1822.

▼**M7**

(26) Ryan C. A., Gildea L. A., Hulette B. C., Dearman R. J., Kimber I., Gerberick G. F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301–316.

(27) Emter R., van der Veen J. W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225–2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No 213, OECD, Pariz.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Pariz.

(30) NAFTA (Sporazum o severnoameriškem prosto-trgovinskem območju) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 str. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (29).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (2).

ARE (element antioksidativnega odziva – *antioxidant response element*): (imenuje se tudi EpRE oziroma element elektrofilnega odziva) je element odziva v zgornji promotorski regiji mnogih genov za zaščito celic in genov faze II. Ko se aktivira z Nfr2, posreduje v transkripcijski indukciji teh genov.

Kemikalija: snov ali zmes.

Koeficient variacije: merilo variabilnosti, ki se za skupino podatkov za ponovljene vzorce izračuna tako, da se standardni odklon deli s srednjo vrednostjo. Lahko se pomnoži s 100, da se izrazi v odstotkih.

$EC_{1,5}$: interpolirana koncentracija za 1,5-kratno indukcijo luciferaze.

IC_{30}: koncentracija, ki vpliva na zmanjšanje viabilnosti celic za 30 %.

IC_{50}: koncentracija, ki vpliva na zmanjšanje viabilnosti celic za 50 %.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki ob izpostavljenosti temu sredstvu lahko povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

I_{max}: največji faktor indukcije luciferazne dejavnosti v primerjavi s kontrolnim vzorcem s topilom (negativno kontrolo), ki se meri za vse koncentracije preskusnih kemikalij.

Keap1: „Kelch-like ECH-associated protein 1“ je senzorska beljakovina, ki lahko uravnava dejavnost Nrf2. V neinduciranih pogojih je senzorska beljakovina Keap1 ciljno usmerjena v transkripcijski dejavnik Nrf2 za ubikvitinacijo in proteolitsko razgradnjo v proteasomu. Kovalentna modifikacija reaktivnih cisteinskih ostankov beljakovine Keap1 z majhnimi molekulami lahko povzroči disociacijo Nrf2 od beljakovine Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo (1).

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

Nrf2: jedrni faktor (izpeljan iz eritroblasta 2)-kot 2 je transkripcijski dejavnik, ki sodeluje pri poteku antioksidativnega odziva. Ko Nrf2 ni ubikvitiniran, se nakopiči v citoplazmi in premakne v jedro, kjer se združi z ARE v zgornji promotorski regiji mnogih genov za zaščito celic ter s tem začne njihovo transkripcijo (8) (10) (11).

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (29).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (29).

Obnovljivost: ujemanje rezultatov, pridobljenih s preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej zanesljivost) (29).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (29).

Kontrola s topilom/vehiklom: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. To je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in je pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (29).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo (1).

Preskusna kemikalija: pojem „preskusna kemikalija“ se uporablja za opisovanje tega, kar se preskuša.

▼M7

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

UVCB: novi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljavna preskusna metoda: preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (29).

▼M7

Dodatek 2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Preobčutljivost kože *in vitro*: luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi KeratinoSens™, pričakovane za 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti $EC_{1.5}$ in IC_{50}, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Te snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila dostopnost na trgu, dostopnost visokokakovostne reference *in vivo* in dostopnost visokokakovostnih podatkov *in vitro* iz preskusa KeratinoSens™.

Preglednica 1

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskus KeratinoSens™

Snovi za preverjanje tehnične usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved *in vivo* (1)	Napoved KeratinoSens™ (2)	Referenčno območje $EC_{1.5}$ (μM) (3)	Referenčno območje IC_{50} (μM) (3)
izopropanol	67-63-0	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
salicilna kislina	69-72-7	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
glicerol	56-81-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 1 000	> 1 000
cinamil alkohol	104-54-1	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	25–175	> 1 000
etilen glikol dimetakrilat	97-90-5	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	5–125	> 500
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	25–250	> 500
metildibromo glutaronitril	35691-65-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močan)	pozitivna	< 20	20–100
4-metilaminofenol sulfat	55-55-0	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močan)	pozitivna	< 12,5	20–200
2,4-dinitro-klorobenzen	97-00-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močan)	pozitivna	< 12,5	5–20

(1) Napovedi nevarnosti (in moči) *in vivo* temeljijo na podatkih LLNA (13). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (24).
(2) Napoved KeratinoSens™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami iz odstavkov 9 in 11 te preskusne metode.
(3) Na podlagi ugotovljenih vrednostih iz preteklih preskusov (12).

▼M7

Dodatek 3

KONTROLA KAKOVOSTI ZA MERITVE LUMINISCENCE

Osnovni preskus za zagotavljanje optimalnih meritev luminiscence pri preskusu KeratinoSens™

Naslednji trije parametri so ključni za zagotavljanje zanesljivih rezultatov z luminometrom:

— zadostna občutljivost, ki omogoča stabilno ozadje v jamicah s kontrolnim vzorcem;

— ni razlik preko plošče zaradi dolgega odčitavanja in

— ni svetlobnega onesnaženja v jamicah poleg močno aktivnih jamic.

Pred preskušanjem je priporočeno, da se zagotovijo ustrezne meritve luminiscence s preskušanjem postavitve kontrolne plošče, kot je opisano spodaj (tri analize).

Postavitev plošče za prvi kontrolni poskus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1 000**	**EGDMA 2 000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**slepa kontrola**

EGDMA = etilen glikol dimetakrilat (št. CAS: 97-90-5), kemikalija z močnimi učinki

CA = cimetov aldehid, pozitivna referenčna kemikalija (št. CAS: 104-55-2)

Analiza kontrole kakovosti bi morala pokazati:

— jasen odziv na odmerek v vrstici D, z vrednostjo I_{max} > 20-krat večja od ozadja (v večini primerov se dosežejo vrednosti I_{max} med 100 in 300);

— ni odziva na odmerek v vrsticah C in E (nobena indukcijska vrednost ni višja od 1,5 (v najboljšem primeru ni višja od 1,3) zaradi morebitnega svetlobnega onesnaženja, zlasti poleg močno aktivnih jamic v vrstici EGDMA;

— ni statistično značilnih razlik med vrsticami A, B, C, E, F in G. (tj. brez razlik preko plošče); in

— variabilnost v kateri koli od vrstic A, B, C, E, F in G ter v jamicah z DMSO v vrstici H bi morala biti manjša od 20 % (tj. stabilno ozadje).

▼M7

B.61 **Preskusna metoda uhajanja fluoresceina za opredeljevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči**

UVOD

Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 460 (2012). Preskusna metoda uhajanja fluoresceina (ang. *Fluorescein Leakage*, FL) je preskusna metoda *in vitro*, ki se lahko uporabi v določenih okoliščinah in s posebnimi omejitvami za razvrstitev kemikalij (snovi in zmesi) med jedke in zelo dražilne snovi za oči, kakor to opredeljujejo Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS) Združenih narodov (ZN) (kategorija 1), Uredba (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi) (CLP) ([1]) (kategorija 1) in Agencija ZDA za varstvo okolja (US EPA) (kategorija I) (1) (2). Za namen te preskusne metode so zelo dražilne snovi za oči opredeljene kot kemikalije, ki po dajanju preskusne kemikalije povzročijo poškodbo očesnega tkiva, ki ni popravljiva v roku 21 dni, ali povzročijo resno fizično okvaro vida, jedke snovi za oči pa so kemikalije, ki povzročijo nepopravljivo poškodbo očesnega tkiva. Te kemikalije so razvrščene v kategorijo 1 po GHS ZN, kategorijo 1 po CLP EU ali kategorijo I po US EPA.

Čeprav se preskusna metoda FL ne obravnava kot veljaven in celovit nadomestek za očesno študijo *in vivo* na kuncih, se vseeno priporoča za uporabo kot del večstopenjske strategije preskušanja za regulativno razvrščanje in označevanje. Priporoča se torej kot prvi korak v okviru pristopa od zgoraj navzdol, da se opredelijo jedke/zelo dražilne snovi za oči, zlasti za omejene vrste kemikalij (tj. vodotopne snovi in zmesi) (3) (4).

Zdaj na splošno velja, da v bližnji prihodnosti noben preskus draženja oči *in vitro* ne bo mogel nadomestiti očesne študije *in vivo* (PM B.5 (5)) za napovedi o celotnem razponu dražilnih učinkov za različne kemijske razrede. Strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjske) strategije preskušanja pa bi morda lahko nadomestile očesno študijo *in vivo* (4). Pristop od zgoraj navzdol (4) je zasnovan za uporabo takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja.

Na podlagi napovednega modela, podrobno opisanega v odstavku 35, se s preskusno metodo FL lahko opredelijo kemikalije v okviru omejenega področja uporabe kot jedke/zelo dražilne snovi za oči (kategorija 1 po GHS ZN; kategorija 1 po CLP EU; kategorija I po US EPA) brez kakršnega koli nadaljnjega preskušanja. Enako se domneva za zmesi, čeprav te niso bile uporabljene pri validaciji. Preskusna metoda FL se torej lahko uporabi za določanje dražilnosti/jedkosti kemikalij za oči v okviru zaporedne strategije preskušanja PM B.5 (5). Vendar če se s preskusno metodo FL za kemikalijo ne predvidi, da je jedka ali zelo dražilna snov za oči, bi bilo to kemikalijo treba preskusiti z eno ali več

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M7

dodatnimi preskusnimi metodami (*in vitro* in/ali *in vivo*), s katerimi se lahko točno opredelijo i) kemikalije, ki so *in vitro* lažno negativne jedke/zelo dražilne snovi za oči na podlagi preskusne metode FL (kategorija 1 po GHS ZN; kategorija 1 po CLP EU; kategorija I po US EPA); ii) kemikalije, ki niso razvrščene med jedke/dražilne snovi za oči (brez kategorije po GHS ZN; brez kategorije po CLP EU; kategorija IV po US EPA); in/ali iii) kemikalije, ki so zmerne/blage dražilne snovi za oči (kategoriji 2A in 2B po GHS ZN; kategorija 2 po CLP EU; kategoriji II in III po US EPA).

Namen te preskusne metode je opisati postopke za oceno potencialne jedkosti in močne dražilnosti preskusne snovi za oči glede na njeno sposobnost, da poškoduje neprepusten, konfluenten, epitelijski monosloj. Celovitost transepitelijske prepustnosti je glavna funkcija epitelija, na primer v veznici in roženici. Transepitelijsko prepustnost nadzira več tesnih stikov. Dokazano je bilo, da je povečanje prepustnosti epitelija roženice *in vivo* povezano s stopnjo vnetja in površinskih poškodb, opaženih, ko pride do draženja oči.

S preskusno metodo FL se po kratkem času izpostavljenosti preskusni kemikaliji toksični učinki merijo na podlagi povečanja prepustnosti natrijevega fluoresceina skozi epitelijski monosloj v celicah pasjih ledvic MDCK (ang. Madin-Darby Canine Kidney), ki se gojijo na prepustnih vstavkih. Količina uhajanja fluoresceina, ki se pojavi, je sorazmerna s kemijsko induciranimi poškodbami tesnih stikov, dezmosomskih stikov in celičnih membran ter jo lahko uporabi za oceno potenciala toksičnosti preskusne kemikalije za oči. V Dodatku 1 je diagram celic MDCK, ki se gojijo na membrani vstavka za preskusno metodo FL.

Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Ta preskusna metoda temelji na protokolu INVITTOX št. 71 (6), ki je bila ocenjen v mednarodni validacijski študiji Evropskega centra za validacijo alternativnih metod (ECVAM) v sodelovanju z Medagencijskim koordinacijskim odborom ZDA za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) in Japonskim centrom za validacijo alternativnih metod (JaCVAM).

Preskusna metoda FL se ne priporoča za opredeljevanje kemikalij, ki bi morale biti razvrščene med blage/zmerne dražilne snovi za oči, ali kemikalij, ki ne bi smele biti razvrščene med dražilne za oči (snovi in zmesi) (tj. kategorija 2A/2B, brez kategorije po GHS; kategorija 2, brez kategorije po CLP EU; kategorija II/III/IV po US EPA), kot je bilo dokazano v validacijski študiji (3) (7).

Ta preskusna metoda je ustrezna samo za vodotopne kemikalije (snovi in zmesi). Potencial zelo močne dražilnosti snovi za oči za kemikalije, ki so topne v vodi in/ali pri katerih razredčenje ne vpliva toksični učinek, se na splošno lahko točno napove z uporabo preskusne metode FL (7). Za razvrstitev kemikalije kot vodotopne v preskusnih pogojih, bi ta morala biti topna v sterilni Hankovi uravnoteženi raztopini soli (ang. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)) s koncentracijo ≥ 250 mg/ml (ena doza nad mejno vrednostjo 100 mg/ml), ki vsebuje kalcij (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in ne vsebuje fenol rdečega. Če pa je preskusna kemikalija topna pri koncentraciji, nižji od 100 mg/ml, vendar že pri tej koncentraciji povzroči 20-odstotno indukcijo FL (torej, FL_{20} < 100 mg/ml), se še vedno lahko razvrsti v kategorijo 1 po GHS ali kategorijo I po EPA.

Omejitve, opredeljene za to preskusno metodo, s področja uporabe izključujejo močne kisline in baze, fiksirne raztopine za celice in lahko hlapne kemikalije. Za te kemikalije so značilni mehanizmi, ki se ne merijo s preskusno metodo FL, npr. močno strjevanje krvi, umiljenje ali specifične reaktivne kemijske lastnosti. Druge opredeljene omejitve za to metodo temeljijo na rezultatih v zvezi z napovedovalno zmogljivostjo za obarvano in viskozno preskusno kemikalijo (7). Obe vrsti kemikalij naj bi bilo po kratkem obdobju izpostavljenosti težko odstraniti iz monosloja, napovedno zmogljivost preskusne metode pa bi bilo mogoče izboljšati, če bi bilo uporabljenih več korakov spiranja. Trdne kemikalije, suspendirane

▼M7

v tekočini, so nagnjene k obarjanju, in včasih je težko določiti končno koncentracijo glede na celice. Če se kemikalije iz teh kemijskih in fizikalnih razredov izključijo iz zbirke podatkov, se točnost FL v sistemih za razvrščanje EU, EPA in GHS bistveno izboljša (7).

Na podlagi namena te preskusne metode (tj. opredeliti samo jedke/zelo dražilne snovi za oči) delež lažno negativnih rezultatov (glej odstavek 13) ni ključen, saj bi bile take kemikalije posledično preskušene z drugimi, ustrezno potrjenimi preskusi *in vitro* ali na kuncih ob upoštevanju regulativnih zahtev in uporabi večstopenjske strategije preskušanja v okviru pristopa, ki temelji na zanesljivosti dokazov (5) (glej tudi odstavka 3 in 4).

Druge opredeljene omejitve preskusne metode FL temeljijo na deležih lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov. Če se je preskusna metoda FL uporabila kot prvi korak v okviru pristopa od zgoraj navzdol, da bi se opredelile jedke/zelo dražilne snovi in zmesi za oči, ki so topne v vodi (kategorija 1 po GHS ZN; kategorija 1 po CLP EU; kategorija I po US EPA), je delež lažno pozitivnih rezultatov za to metodo znašal od 7 % (7/103; GHS ZN in CLP EU) do 9 % (9/99; US EPA), delež lažno negativnih rezultatov pa od 54 % (15/28; US EPA) do 56 % (27/48; GHS ZN in CLP EU) v primerjavi z rezultati *in vivo*. Kemijske skupine, ki s preskusno metodo FL pokažejo lažno pozitivne in/ali lažno negativne rezultate, tukaj niso opredeljene.

Določene tehnične omejitve so posebej značilne za celično kulturo MDCK. Tesni stiki, ki preprečujejo prehajanje barvila natrijevega fluoresceina skozi monosloj, so z naraščanjem števila pasaž celic vedno bolj ogroženi. Nepopolno nastajanje tesnih stikov pomeni večje FL v netretiranih kontrolnih vzorcih. Torej je pomembno opredeliti največje dopustno uhajanje v netretiranih kontrolnih vzorcih (glej odstavek 38: 0-odstotno uhajanje). Kot pri vseh preskusih *in vitro* se lahko celice sčasoma spremenijo, zato je ključnega pomena navesti območja števila pasaž za analize.

V nekaterih primerih se bo morda trenutno področje uporabe razširilo, vendar samo po analizi obširnejše zbirke podatkov proučenih preskusnih kemikalij, po možnosti pridobljenih na podlagi preskušanja (3). Ta preskusna metoda bo ustrezno posodobljena ob upoštevanju novih informacij in podatkov.

Vsak laboratorij, ki ta preskus opravlja prvič, mora uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 3. Laboratorij lahko te kemikalije uporabi, da dokaže svojo tehnično usposobljenost za izvajanje preskusne metode FL, preden podatke preskusa FL predloži za namene regulativne razvrstitve glede na nevarnosti.

NAČELO PRESKUSA

Preskusna metoda FL je preskus *in vitro*, ki temelji na citotoksičnosti in funkciji celic, izvaja pa se jo na konfluentnem monosloju cevastih epitelijskih celic MDCK CB997, ki se gojijo na polprepustnih vstavkih in so model za nemnožeče se stanje epitelija roženice *in vivo*. Celična linija MDCK je dobro uveljavljena ter tvori tesne stike in dezmosomske stike, podobne tistim na apikalni strani epitelija veznice in roženice. Tesni in dezmosomski stiki *in vivo* preprečujejo, da bi topljenci in tujki prodrli v epitelij roženice. Izguba transepitelijske neprepustnosti zaradi poškodovanih tesnih stikov in dezmosomskih stikov je eden od zgodnjih dogodkov pri kemijsko induciranem draženju oči.

▼M7

Preskusna kemikalija se doda na konfluentno plast celic, ki se gojijo na apikalni strani vstavka. Običajno se uporablja kratka, enominutna izpostavljenost, ki upošteva normalno stopnjo očistka za izpostavljenost pri ljudeh. Prednost kratkega obdobja izpostavljenosti je možnost preskušanja čistih snovi in zmesi, topnih v vodi, če jih je mogoče po obdobju izpostavljenosti enostavno odstraniti. To omogoča bolj neposredno primerjavo rezultatov s kemičnimi učinki pri ljudeh. Preskusna kemikalija se nato odstrani, na apikalno stran monosloja pa se za 30 minut doda netoksično, zelo flourescentno barvilo natrijevega fluoresceina. Škoda, ki jo preskusna kemikalija povzroči na tesnih stikih, se določi glede na količino fluoresceina, ki uide skozi celično plast v opredeljenem časovnem obdobju.

Količina barvila natrijevega fluoresceina, ki prodre skozi monosloj in membrano vstavka v določeno prostornino raztopine v jamici (v katero uhaja barvilo natrijevega fluoresceina), se določi s spektrofluorimetričnim merjenjem koncentracije fluoresceina v jamici. Obseg uhajanja fluoresceina (FL) se izračuna z upoštevanjem meritev intenzitete fluorescence (FI) v dveh kontrolnih vzorcih: slepi kontrolni vzorec in kontrolni vzorec z največjim uhajanjem. Odstotek uhajanja in s tem obseg škode na tesnih stikih se glede na te kontrolne vzorce izrazi za vse določene koncentracije preskusne kemikalije. Nato se izračuna FL_{20} (tj. koncentracija, ki povzroči 20-odstotno FL glede na vrednost, zabeleženo pri netretiranem konfluentnem monosloju in vstavkih brez celic). Vrednost FL_{20} (mg/ml) se uporabi v napovednem modelu za opredelitev jedkih in zelo dražilnih snovi za oči (glej odstavek 35).

Izkoristek je pomemben del toksičnih lastnosti preskusne kemikalije, ki se tudi oceni s preskusom draženja oči *in vivo*. Predhodne analize so pokazale, da bi lahko podatki o izkoristku (do 72 ur po izpostavljenosti kemikaliji) morda povečali napovedovalna zmogljivost protokola INVITTOX št. 71, vendar so potrebne nadaljnje ocene in dodatni podatki, po možnosti pridobljeni z nadaljnjim preskušanjem (6). Ta preskusna metoda bo ustrezno posodobljena ob upoštevanju novih informacij in podatkov.

POSTOPEK

Priprava celičnega monosloja

Monosloj celic MDCK CB997 se pripravi z uporabo subkonfluentnih celic, ki se gojijo v bučkah s celično kulturo v zmesi gojišča DMEM/zmesi hranil F12 (1-kratni koncentrat z L-glutaminom, 15 mM pufra HEPES, kalcij (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in 10-odstotni, toplotno inaktivirani FCS/FBS). Pomembno je, da morajo vsi mediji/raztopine, ki se uporabljajo pri preskusu FL, vsebovati kalcij s koncentracijo med 1,8 mM (200 mg/l) in 1,0 mM (111 mg/l), da se zagotovi nastajanje in celovitost tesnih stikov. Območje števila pasaž celic bi se moralo nadzorovati, da se zagotovi enakomerno in ponovljivo nastajanje tesnih stikov. Po možnosti bi morale biti celice znotraj območja pasaž 3–30 od odtajanja, saj majo celice znotraj tega območja podobno funkcionalnost, kar pripomore k ponovljivosti rezultatov preskusa.

Pred izvedbo preskusne metode FL se celice ločijo od bučke s tripsinizacijo, centrifugirajo in ustrezno število celic se nasadi v vstavke v ploščah s 24 jamicami (glej Dodatek 1). Za nasaditev celic se morajo uporabiti vstavki s premerom dvanajst mm, membrano iz mešanih celuloznih estrov, debelino 80–150 μm in velikostjo pore 0,45 μm. V validacijski študiji so bili uporabljeni 12 mm vstavki Millicell-HA. Lastnosti vstavka in vrste membrane so pomembni, saj lahko vplivajo na rast celic in vezavo kemikalije. Določene vrste kemikalij se morda vežejo z membrano vstavka Millicell-HA, kar bi lahko vplivalo na razlago rezultatov. Če se uporabijo druge membrane, se morajo za dokazovanje enakovrednosti uporabiti kemikalije za preverjanje usposobljenosti (glej Dodatek 3).

▼M7

Vezava kemikalije na membrano vstavka je pogostejša pri kationskih kemikalijah, na primer benzalkonijevem kloridu, saj jih privlači membrana z nabojem (7). Vezava kemikalije na membrano vstavka lahko podaljša obdobje izpostavljenosti kemikaliji, kar lahko vodi v precenitev potenciala toksičnosti kemikalije, lahko pa tudi fizično zmanjša uhajanje fluoresceina skozi vstavek zaradi vezave barvila na kationsko kemikalijo, ki se veže na membrano vstavka, kar lahko vodi v podcenitev potenciala toksičnosti kemikalije. To se lahko enostavno spremlja tako, da se najvišji koncentraciji preiskovane kemikalije izpostavi samo membrana, nato pa se za standardni čas doda barvilo natrijevega fluoresceina z normalno koncentracijo (kontrola brez celic). Če pride do vezave barvila natrijevega fluoresceina, je po spiranju preskusnega materiala membrana vstavka videti rumena. Zato je bistvenega pomena poznati vezivne lastnosti preskusne kemikalije, da se lahko razloži učinek kemikalije na celice.

Ob nasaditvi celic v vstavke bi moral med izpostavljenostjo kemikaliji nastati konfluentni monosloj. Dodati je treba 1,6 x 10^5 celic na vstavek (400 µl celične suspenzije z gostoto 4 x 10^5 celic/ml). Pod temi pogoji običajno po 96 urah v kulturi nastane konfluentni monosloj. Vstavke je treba pred nasaditvijo vizualno pregledati in zagotoviti, da so kakršne koli poškodbe, ki so bile zabeležene med vizualno kontrolo, opisano v odstavku 30, nastale zaradi ravnanja.

Celične kulture MDCK se morajo hraniti v inkubatorjih z navlaženo atmosfero pri 5 % ± 1 % CO_2 in 37 ± 1 °C. Celice ne smejo biti kontaminirane z bakterijami, virusi, mikoplazmo ali glivami.

Dodajanje preskusnih in kontrolnih kemikalij

Za vsako ponovitev preskusa je treba pripraviti svežo osnovno raztopino s preskusno kemikalijo in jo porabiti v 30 minutah od priprave. Preskusne kemikalije je treba pripraviti v Hankovi uravnoteženi solni raztopini (HBSS) s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega, da se prepreči vezava na serumske beljakovine. Pred preskušanjem je treba oceniti topnost kemikalije pri 250 mg/ml v HBSS. Če pri tej koncentraciji v 30 minutah kemikalija tvori stabilno suspenzijo ali emulzijo (tj. ohrani enakomernost ter se ne usede ali loči v več faz), se HBSS še vedno lahko uporabi kot topilo. Če pa se za kemikalijo ugotovi, da pri tej koncentraciji ni topna v HBSS, je treba razmisliti o uporabi drugih preskusnih metod namesto FL. V primerih, ko se ugotovi, da kemikalija ni topna v HBSS, je treba tehtno razmisliti o uporabi lahkega mineralnega olja kot topila, saj ni na voljo dovolj podatkov, da bi se dokončno ugotovila učinkovitost preskusa FL v takih pogojih.

Vse kemikalije, ki bodo preskušene, se pripravijo v sterilni HBSS iz osnovne raztopine s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega, in sicer pri petih nespremenljivih koncentracijah, razredčenih na podlagi teže na prostornino: 1, 25, 100, 250 mg/ml in čista ali nasičena raztopina. Ob preskušanju trdne kemikalije je treba vključiti zelo visoko koncentracijo 750 mg/ml. To koncentracijo kemikalije bo morda treba na celice dodati z uporabo pipete za neposredno izpodrivanje tlaka. Če se ugotovi, da toksičnost znaša med 25 in 100 mg/ml, je treba dvakrat preskusiti naslednje dodatne koncentracije: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Če so bila izpolnjena merila za sprejemljivost, je treba iz teh koncentracij izpeljati vrednost FL_{20}.

Preskusne kemikalije se dodajo na konfluentne celične monosloje po odstranitvi gojišča celične kulture ter dvakratnem spiranju s sterilno, toplo (37 °C) HBSS s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega. Pred tem se vizualno preveri filtre za kakršne koli predhodne poškodbe, ki bi se lahko zmotno pripisale morebitni nezdružljivosti s preskusnimi kemikalijami. Za vsako koncentracijo preskusne kemikalije in kontrolne vzorce se morajo za

▼M7

vsako ponovitev uporabiti vsaj trije ponovljeni vzorci. Po 1 minuti izpostavljenosti pri sobni temperaturi je treba previdno odstraniti preskusno kemikalijo z aspiracijo, monosloj je treba dvakrat sprati s sterilno, toplo (37 °C) HBSS s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega ter takoj je treba izmeriti uhajanje fluoresceina.

V vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno (NK) in pozitivno kontrolo (PK), da se dokaže, da sta celovitost monosloja (NK) in občutljivost celic (PK) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana kemikalija PK je Brij 35 (št. CAS 9002-92-0) pri 100 mg/ml. Pri tej koncentraciji bi se moralo ugotoviti približno 30-odstotno uhajanje fluoresceina (sprejemljivo območje uhajanja fluoresceina, tj. poškodovanosti celične plasti, je 20–40 %). Predlagana kemikalija NK je HBSS s kalcijem (s koncentracijo 1,0–1,8 mM) in brez fenol rdečega (netretirani, slepi kontrolni vzorec). Za izračun vrednosti FL_{20} bi vsaka ponovitev morala vključevati tudi kontrolni vzorec z največjim uhajanjem. Največje uhajanje se določi z uporabo kontrolnih vstavkov brez celic.

Določanje stopnje prepuščanja fluoresceina

Takoj po odstranitvi preskusnih in kontrolnih kemikalij se v vstavke (npr. Millicell-HA) doda 400 µl 0,1 mg/ml raztopine natrijevega fluoresceina (0,01 % (m/v) v HBSS s kalcijem [s koncentracijo 1,0–1,8 mM] in brez fenol rdečega). Kulture se pustijo 30 minut pri sobni temperaturi. Ob koncu inkubacije s fluoresceinom se vstavki previdno odstranijo iz vsake jamice. Vsak filter se vizualno pregleda in zabeleži se kakršna koli poškodba, ki je morda nastala med uporabo.

Količina fluoresceina, ki je prodrla skozi monosloj in vstavek, se količinsko opredeli v raztopini, ki je ostala v jamicah po odstranitvi vstavkov. Meritve se opravijo s spektrofluorimetrom pri valovni dolžini ekscitacije in emisije, ki znaša 485 nm oziroma 530 nm. Občutljivost spektrofluorimetra mora biti nastavljena tako, da je najvišja številčna razlika med največjo FL (vstavki brez celic) in najmanjšo FL (vstavek s konfluentnim monoslojem, tretiran z NK). Zaradi razlik v uporabljenem spektrofluorimetru bi se morala uporabiti občutljivost, ki bo zaznala intenziteto fluorescence > 4 000 pri kontrolnem vzorcu z največjim uhajanjem fluoresceina. Največja vrednost FL ne bi smela biti višja od 9 999. Največja intenziteta uhajanja fluoresceina bi morala biti v linearnem območju uporabljenega spektrofluorimetra.

Razlaga rezultatov in napovedni model

Količina FL je sorazmerna s kemijsko induciranimi poškodbami tesnih stikov. Odstotek FL za vsako preskušeno koncentracijo kemikalije se izračuna iz vrednosti FL, ki so bile pridobljene za preskusno kemikalijo z upoštevanjem vrednosti FL iz NK (meritev iz konfluentnega monosloja celic, tretiranega z NK) in kontrolni vzorec z največjim uhajanjem (meritev za količino FL skozi vstavek brez celic).

Srednja vrednost intenzitete fluorescence pri največjem uhajanju = x

Srednja vrednost intenzitete fluorescence pri 0-odstotnem uhajanju (NK) = y

Srednja vrednost 100-odstotnega uhajanja se izračuna tako, da se od srednje vrednosti pri največjem uhajanju odšteje srednja vrednost pri 0-odstotnem uhajanju,

tj. $x - y = z$.

Odstotek uhajanja za vsak nespremenljivi odmerek se izračuna tako, da se od srednje vrednosti intenzitete fluorescence za meritve treh ponovljenih vzorcev (m) odšteje vrednost pri 0-odstotnem uhajanju, ta vrednost pa nato deli z vrednostjo pri 100-odstotnem uhajanju, tj. $\% FL = [(m - y) / z] \times 100\ \%$, pri čemer je:

▼M7

m = srednja vrednost intenzitete fluorescence za tri ponovljene meritve za določeno koncentracijo

% FL = odstotek fluoresceina, ki preide skozi celično plast

Uporabiti je treba naslednjo enačbo za izračun koncentracije kemikalije, ki povzroči 20 % FL:

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

pri čemer je:

D = % inhibicije

A = % poškodb (20 % uhajanje fluoresceina)

B = % uhajanja fluoresceina < A

C = % uhajanja fluoresceina > A

M_C = koncentracija (mg/ml) C

M_B = koncentracija (mg/ml) B

V nadaljevanju je navedena mejna vrednost FL_{20}, s katero se kemikalije predvidijo kot jedke/zelo dražilne snovi za oči:

FL_{20} (mg/ml)	R in O GHS ZN	R in O CLP EU	R in O US EPA
≤ 100	kategorija 1	kategorija 1	kategorija I

R in O: razvrstitev in označevanje

Preskusna metoda FL se priporoča samo za opredeljevanje vodotopnih jedkih in zelo dražilnih snovi za oči(kategorija 1 po GHS ZN, kategorija 1 po CLP EU, kategorija I po US EPA) (glej odstavka 1 in 10).

Za opredelitev vodotopnih kemikalij (snovi in zmesi) (3) (6) (7) kot „povzroča hudo poškodbo oči“ (kategorija 1 po GHS ZN/CLP EU) ali „jedka ali zelo dražilna snov za oči“ (kategorija I po US EPA) bi morala preskusna kemikalija pri koncentraciji ≤ 100 mg/ml inducirati vrednost FL_{20}.

Sprejemljivost rezultatov

Srednja vrednost pri največjem uhajanju fluoresceina (x) mora biti višja od 4 000 (glej odstavek 31), srednja vrednost pri 0-odstotnem uhajanju (y) mora biti enaka ali nižja od 300, srednja vrednost pri 100-odstotnem uhajanju (z) pa mora biti med 3 700 in 6 000.

Preskus se obravnava kot sprejemljiv, če je bila pri pozitivni kontroli opažena 20- do 40-odstotna poškodovanost celične plasti (meritev kot % uhajanja fluoresceina).

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

Podatki iz posameznih jamic s ponovljenimi vzorci (npr. vrednosti intenzitete fluorescence in izračunani podatki o odstotku FL za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrstitvijo) za vsako ponovitev preskusa morajo biti navedeni v obliki preglednice. Poleg tega je treba v poročilu navesti srednje vrednosti ± standardni odklon za posamezne ponovljene meritve v vsaki ponovitvi preskusa.

▼M7

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusne in kontrolne kemikalije:

— kemijska imena, na primer strukturno ime, ki ga uporablja Služba za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS), ki jim sledijo druga imena, če so znana;

— številka CAS kemikalije, če je znana;

— čistost in sestava snovi ali zmesi (v masnih deležih), če so te informacije na voljo;

— fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije (npr. agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, stabilnost, topnost v vodi, kemijski razred);

— obdelava preskusne/kontrolne kemikalije pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— pogoji shranjevanja.

Utemeljitev preskusne metode in uporabljenega protokola:

— vključevati mora preudarke v zvezi s področjem uporabe in omejitve preskusne metode.

Preskusni pogoji:

— opis uporabljenega celičnega sistema, vključno s potrdilom o avtentičnosti in statusom mikoplazme celične linije;

— podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku;

— uporabljene koncentracije kemikalije;

— trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji;

— trajanje inkubacije s fluoresceinom;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka;

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje;

— navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov (npr. negativne in pozitivne kontrole, primerjalne kemikalije, če je ustrezno);

— informacije o tehnični usposobljenosti, ki jo je dokazal laboratorij.

Rezultati:

— preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah, kontrolah za vsako ponovitev preskusa in vsako ponovljeno meritev (vključno s posameznimi rezultati, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni);

— izpeljane razvrstitve z navedbo napovednega modela in/ali uporabljenih meril za odločitev;

— opis drugih opaženih učinkov.

▼**M7**

Razprava o rezultatih:

— vključevati mora preudarke o nedokončnem rezultatu (odstavek 35: FL_{20} > 100 mg/ml) in nadaljnjem preskušanju.

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) ZN (2009). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), tretja revidirana izdaja, New York in Ženeva: Publikacije Združenih narodov. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html].

(2) US EPA (1996). Label Review Manual: druga izdaja, EPA737-B-96-001, Washington DC: Agencija ZDA za varstvo okolja (US EPA).

(3) EC-ECVAM (2009). Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. idr. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.

(5) Poglavje B.5 te priloge, *Akutno draženje oči/jedkost za oči*.

(6) EC-ECVAM (1999). protokol INVITOX št. 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM). Na voljo na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu.

(7) EC-ECVAM (2008). Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

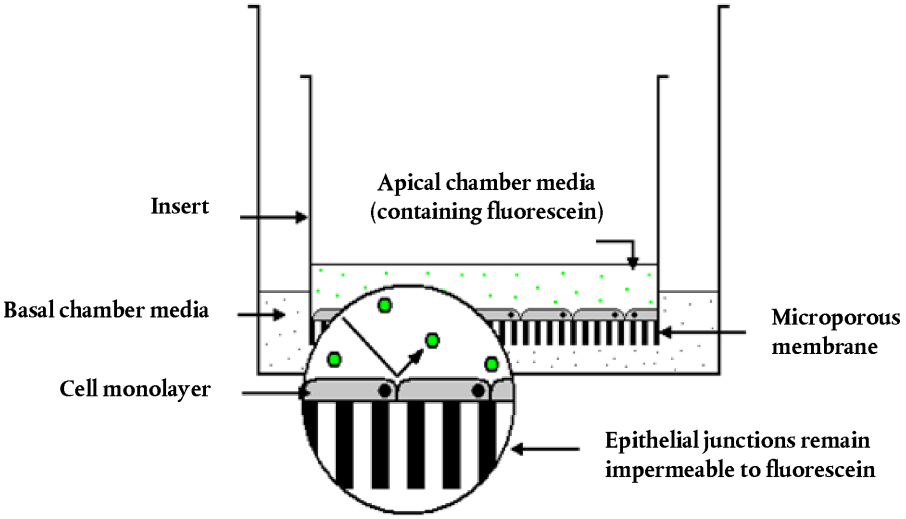
(8) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment št. 34. OECD, Pariz.

▼M7

Dodatek 1

DIAGRAM CELIC MDCK, KI SE GOJIJO NA MEMBRANI VSTAVKA ZA PRESKUSNO METODO FL

Konfluentni sloj celic MDCK se goji na polprepustni membrani vstavka. Vstavki se položijo v jamice plošče s 24 jamicami.



Vir slike: Wilkinson, P. J. (2006). Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Doktorska disertacija, Univerza v Nottinghamu, Združeno kraljestvo.

▼M7

Dodatek 2

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode.

Kemikalija: snov ali zmes.

Kategorija I po EPA: kemikalije, ki so jedke (nepopravljivo uničenje očesnega tkiva) ali vplivajo na roženico oziroma jo dražijo več kot 21 dni (2).

CLP EU (Uredba (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi): v Evropski uniji (EU) izvaja Globalno usklajeni sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) Združenih narodov (GHS ZN).

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

FL_{20}: to vrednost je mogoče oceniti z opredelitvijo koncentracije, pri kateri preskušene kemikalije povzročijo 20-odstotno uhajanje fluoresceina skozi celično plast.

Uhajanje fluoresceina: količina fluoresceina, ki prodre skozi celično plast; izmeri se s spektrofluorimetrom.

GHS (Globalno usklajeni sistem Združenih narodov (ZN) za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje.

Kategorija 1 po GHS: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki ob izpostavljenosti temu sredstvu lahko povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Zmes: v okviru GHS ZN se uporablja kot zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo.

Negativna kontrola: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Brez razvrstitve: kemikalije,ki niso razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 1, 2A ali 2B po GHS ZN; kategorije 1 ali 2 po CLP EU; ali kategorije I, II ali III po US EPA.

Jedka snov za oči: (a) kemikalija, ki povzroča nepopravljivo poškodbo očesnega tkiva; (b) kemikalije, ki so razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 1 po GHS ZN; kategorije 1 po CLP EU; ali kategorije I po US EPA.

▼M7

Dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki po dodajanju na sprednjo površino očesa povzroča popravljivo poškodbo očesa; (b) kemikalije, ki so razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 2A ali 2B po GHS ZN; kategorije 2 po CLP EU; ali kategorije II ali III po US EPA.

Zelo dražilna snov za oči: (a) kemikalija, ki po dodajanju na sprednjo površino očesa povzroči poškodbo očesnega tkiva, ki v 21 dneh po nanosu ne izgine, ali povzroči resno fizično okvaro vida; (b) kemikalije, ki so razvrščene med dražilne snovi za oči kategorije 1 po GHS ZN; kategorije 1 po CLP EU; ali kategorije I po US EPA.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko oceni variabilnost odziva pozitivne kontrole v daljšem časovnem obdobju, stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Kemikalije za preverjanje usposobljenosti: podskupina seznama referenčnih kemikalij, ki jih lahko uporabi laboratorij, da dokaže usposobljenost za validirano, referenčno preskusno metodo.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (8).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti.

Nadomestni preskus: preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja, ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot se uporablja.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (8).

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se

▼M7

določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno negativno kontrolo ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s tem preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode.

Snov: v okviru GHS ZN se uporablja kot kemijski element in njegove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (8).

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti kemikalije.

▼M7

Dodatek 3

KEMIKALIJE ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI ZA PRESKUSNO METODO FL

Pred redno uporabo te preskusne metode morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno opredelijo razvrstitev med jedke snovi za oči za 8 kemikalij, ki so priporočene v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane tako, da predstavljajo vrsto odzivov za lokalno draženje/jedkost za oči, ki temelji na rezultatih očesne študije *in vivo* na kuncih (TG 405, PM B.5(5)) (tj. kategorije 1, 2A in 2B ali brez razvrstitve po GHS ZN). Ob upoštevanju validirane uporabnosti preskusa FL (tj. opredeljevanje samo jedkih/zelo dražilnih snovi za oči) pa za dokaz usposobljenosti obstajata samo dva rezultata preskusa za namene razvrstitve (jedka/zelo dražilna snov za oči ali nejedka/lažje dražilna snov za oči). Druga merila za izbiro so bila dostopnost kemikalij na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in visokokakovostni podatki iz preskusne metode FL. Zato so bile kemikalije za preverjanje usposobljenosti izbrane na podlagi dokumenta „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing“ (dokument o pregledu ozadja v preskusu uhajanja fluoresceina kot alternativne metode za preskušanje dražilnosti oči) (8), ki je bil uporabljen za retrospektivno validacijo preskusne metode FL.

Preglednica 1

Priporočene kemikalije za dokazovanje tehnične usposobljenosti za FL

Kemikalija	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Agregatno stanje	Razvrstitev *in vivo* (2)	Razvrstitev *in vitro* (3)
benzalkonijev klorid (5-odstotni)	8001-54-5	onijska spojina	tekočina	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
prometazin hidroklorid	58-33-3	amin/amidin, heterociklična spojina, organska žveplova spojina	trdna snov	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
natrijev hidroksid (10 %)	1310-73-2	baza	tekočina	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
natrijev lavril sulfat (15 %)	151-21-3	karboksilna kislina (sol)	tekočina	kategorija 1	jedka/zelo dražilna snov
4-karboksi-benzaldehid	619-66-9	karboksilna kislina, aldehid	trdna snov	kategorija 2(A)	nejedka/lažje dražilna snov
amonijev nitrat	6484-52-2	anorganska sol	trdna snov	kategorija 2(A)	nejedka/lažje dražilna snov
etil-2-metil acetoacetat	609-14-3	keton, ester	tekočina	kategorija 2(B)	nejedka/lažje dražilna snov
glicerol	56-81-5	alkohol	tekočina	brez kategorije	nejedka/lažje dražilna snov

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov

(1) Vsaki preskusni kemikaliji so bili dodeljeni kemijski razredi, pri čemer se je uporabil standardni sistem za razvrščanje, ki temelji na sistemu za razvrščanje MeSH (na voljo na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na podlagi rezultatov očesne študije *in vivo* na kuncih (OECD TG 405, PM B.5) in v skladu z GHS ZN in CLP EU.

(3) Na podlagi rezultatov, pridobljenih s FL (protokol INVITTOX št. 71(6)).

▼M7

B.62 **KOMETNI PRESKUS *IN VIVO* V ALKALNIH POGOJIH PRI SESALCIH**

UVOD

Ta preskusna metoda (PM) je enakovredna Smernici za preskušanje (TG) OECD 489 (2016). Kometni preskus *in vivo* v alkalnih pogojih (gelska elektroforeza posamezne celice; v nadaljnjem besedilu preprosto kometni preskus) se uporablja za zaznavanje prelomov verige DNK v celicah ali jedrih, izoliranih iz več tkiv živali, navadno glodalcev, ki so bili izpostavljeni potencialno genotoksičnim materialom. Več skupin strokovnjakov je proučilo in objavilo priporočila za kometni preskus (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Ta preskusna metoda je del nabora preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. Pripravljen je dokument OECD, ki zagotavlja jedrnate informacije o preskušanju v zvezi z genetsko tokskikologijo in pregled nedavnih sprememb teh preskusnih smernic (11).

Namen kometnega preskusa je opredeliti kemikalije, ki povzročajo poškodbe DNK. Kometni preskus lahko v alkalnih pogojih (pH > 13) zazna prelome ene in dveh verig, ki na primer izhajajo iz neposrednih interakcij z DNK ali alkalno labilnih mest ali so posledica vmesnih stopenj prelomov verig DNK zaradi popravljanja poškodb DNK z izrezovanjem. Ti prelomi verig se lahko popravijo brez trajnega učinka, so za celico smrtni ali pa se fiksirajo v mutacijo, iz katere nastane stalno spremenjena celica, sposobna preživetja. To lahko povzroči tudi poškodbe kromosomov, ki so povezane z mnogimi boleznimi ljudi, vključno z rakom.

Uradni validacijski preskus kometnega preskusa *in vivo* pri glodalcih je bil izveden v letih 2006–2012, usklajeval pa ga je Japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) v sodelovanju z Evropskim centrom za validacijo alternativnih metod (ECVAM), Medagencijskim koordinacijskim odborom za validacijo alternativnih metod (ICCVAM) in Medagencijskim centrom NTP za ocenjevanje alternativnih toksikoloških metod (NICEATM) (12). Ta preskusna metoda vključuje priporočeno uporabo in omejitve kometnega preskusa ter temelji na končnem protokolu (12), uporabljenem v validacijskem preskusu, ter dodatnih ustreznih objavljenih in neobjavljenih podatkih (ki so v lasti laboratorijev).

Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1. Opozoriti je treba, da se za ta preskus lahko uporabi veliko različnih sistemov (mikroskopski preparati, gelski nosilci, 96-jamične mikrotitrske plošče itd.). Zaradi večje pripravnosti se v preostalem dokumentu uporablja izraz „objektno stekelce“ ali „preparat“, ki zajema tudi vse druge sisteme.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

Kometni preskus je metoda za merjenje prelomov verig DNK v evkariotskih celicah. Posamezne celice/jedra, vstavljene v agarozo na objektnem stekelcu, se lizirajo z detergentom in visoko koncentracijo soli. Med lizo se razgradijo celične in jedrne membrane, pri čemer se odvijejo spiralaste zanke DNK, ki se na splošno imenujejo nukleoidi in fragmenti DNK. Elektroforeza pri visoki vrednosti pH povzroči oblikovanje struktur, podobnih kometom, ki jih je z uporabo ustreznih fluorescentnih barvil mogoče opazovati s fluorescenčno mikroskopijo; fragmenti DNK migrirajo iz „glave“ v „rep“ kometa glede na njihovo velikost, iz intenzivnosti repa kometa glede na skupno intenzivnost (glava in rep) pa je razvidna količina prelomov DNK (13) (14) (15).

Kometni preskus *in vivo* v alkalnih pogojih je zlasti ustrezen za ocenjevanje genotoksičnih lastnosti, saj so rezultati preskusa odvisni od procesov absorpcije, porazdelitve, metabolizma in izločanja (ADME) *in vivo* ter tudi od procesov popravljanja poškodb DNK. Ti se lahko razlikujejo med vrstami, tkivi in vrstami poškodb DNK.

▼M7

Za izpolnitev zahtev glede dobrobiti živali, zlasti zmanjšanje uporabe živali (načela 3R – nadomestitev, zmanjšanje in izboljšanje, ang. replacement, reduction and refinement), se ta preskus lahko združi s drugimi toksikološkimi študijami, npr. toksikološkimi študijami s ponavljajočim se odmerkom (10) (16) (17), ali pa se končna točka združi z drugimi genotoksičnimi končnimi točkami, na primer *in vivo* preskusom mikronukleusov v eritrocitih sesalcev (18) (19) (20). Kometni preskus se najpogosteje izvaja na glodalcih, čeprav je bil uporabljen tudi pri drugih sesalskih in nesesalskih vrstah. Uporaba neglodalskih vrst bi morala biti znanstveno in etično utemeljena za vsak primer posebej in močno se priporoča, da se kometni preskus na neglodalskih vrstah izvede samo v okviru druge študije toksičnosti in ne kot samostojni preskus.

Način izpostavljenosti in tkiva, ki bodo proučevana, je treba izbrati na podlagi vseh razpoložljivih/obstoječih informacij o preskusnih kemikalijah, npr. predvidenega/pričakovanega načina izpostavljenosti pri ljudeh, metabolizma in porazdelitve, potenciala za učinke na mestu stika, opozorilne strukture, druge podatke o genotoksičnosti ali toksičnosti in namena študije. Kadar je to ustrezno, se torej lahko potencial genotoksičnosti preskusnih kemikalij analizira v ciljnih tkivih z rakotvornimi in/ali drugimi toksičnimi učinki. Preskus se obravnava kot uporaben tudi za nadaljnje preiskave genotoksičnosti, ki jo zazna sistem *in vitro*. Izvedba kometnega preskusa *in vivo* na preiskovanem tkivu je primerna, kadar se lahko razumno pričakuje, da bo preiskovano tkivo ustrezno izpostavljeno.

Preskus je bil najobširneje validiran v somatskih tkivih podgan moškega spola v medlaboratorijskih študijah, kot je poskus JaCVAM (12) in kot je navedeno v Rothfuss idr., 2010 (10). V mednarodnem validacijskem preskusu JaCVAM so bila uporabljena jetra in želodec. Jetra zato, ker so najaktivnejši organ v metabolizmu kemikalij, pogosto pa tudi ciljni organ za rakotvornost. Želodec pa zato, ker je običajno prvo mesto kontakta za kemikalije po oralni izpostavljenosti, čeprav bi se kot tkiva, ki so mesto stika, morala upoštevati tudi druga območja prebavnega trakta, na primer dvanajsternik in tešče črevo, ter bi se lahko obravnavala kot pomembnejša za ljudi kot žlezni želodec glodalcev. Treba je paziti, da se zagotovi, da takšna tkiva niso izpostavljena previsokim koncentracijam preskusne kemikalije (21). Ta tehnika se načeloma lahko uporabi za katero koli tkivo, iz katerega je mogoče pripraviti suspenzijo s posameznimi celicami/jedri, ki jo je mogoče analizirati. Iz podatkov, ki so v lasti več laboratorijev, je razvidna uspešna uporaba te tehnike na več različnih tkivih in mnoge publikacije so prikazale njeno uporabnost ne samo na jetrih in želodcu, ampak tudi na drugih organih ali tkivih, npr. teščem črevu (22), ledvicah (23) (24), koži (25) (26) ali mehurju (27) (28), pljučnih celicah in celicah bronhoalveolarnega izpirka (pomembno za študije kemikalij, ki se vdihavajo) (29) (30), preskusi pa so bili izvedeni tudi na več organih (31) (32).

Čeprav morda obstaja zanimanje za genotoksične učinke v zarodnih celicah, je treba opozoriti, da se standardni kometni preskus v alkalnih pogojih, kot je opisan v tej preskusni metodi, ne obravnava kot ustrezen za merjenje prelomov verig DNK v zrelih zarodnih celicah. Ker so bile v pregledu virov o uporabi kometnega preskusa za genotoksičnost za zarodne celice (33) navedene visoke in spremenljive ravni ozadja pri poškodbah DNK, bi bilo treba spremeniti protokol ter izboljšati standardizacijo in validacijske študije, preden se lahko kometni preskus na zrelih zarodnih celicah (npr. semenčicah) vključi v preskusno metodo. Poleg tega priporočeni režim izpostavljenosti, opisan v tej preskusni metodi, ni optimalen in bi bila za smiselno analizo prelomov DNK v zrelih semenčicah potrebna daljša izpostavljenost ali vzorčenje. Genotoksični učinki, kot so bili izmerjeni s kometnim preskusom na celicah mod v različnih fazah razločevanja, so bili opisani v virih (34) (35). Treba pa je opozoriti, da spolne žleze vsebujejo mešanico somatskih in zarodnih celic. Zato iz pozitivnih rezultatov za celotno spolno žlezo (modo) ni nujno mogoče sklepati tudi na poškodbe zarodnih celic. Kažejo pa, da so preskušene kemikalije in/ali njihovi metaboliti dosegli spolno žlezo.

▼M7

S standardnimi preskusnimi pogoji kometnega preskusa ni mogoče zanesljivo zaznati navzkrižnih povezav. V določenih prilagojenih preskusnih pogojih se lahko zaznajo navzkrižne povezave DNK-DNK in DNK-beljakovina ter druge spremembe baz, na primer oksidirane baze (23) (36) (37) (38) (39). Vendar je za ustrezno opredelitev potrebnih prilagoditev protokola potrebno nadaljnje delo. Zaznavanje navzkrižnih povezovalcev ni glavni namen preskusa, kot je opisan v tem dokumentu. Preskus kljub prilagoditvam ni primeren za zaznavanje anevgenov.

V okviru trenutnega znanja je s kometnim preskusom *in vivo* povezanih več dodatnih omejitev (glej Dodatek 3). Preskusna metoda se bo v prihodnosti predvidoma pregledala in po potrebi revidirala glede na pridobljene izkušnje.

Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi in pridobivanje podatkov za predvideni regulativni namen bi bilo treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO METODE

Živali se primerno izpostavijo preskusni kemikaliji. Podroben opis odmerjanja in vzorčenja je naveden v odstavkih 36 do 40. Ob izbranih časih vzorčenja se secirajo preiskovana tkiva in pripravijo suspenzije s posameznimi celicami/jedri (lahko se izvede perfuzija *in situ*, kadar velja za uporabno, npr. na jetrih), ki se nato vstavijo v mehki agar, da se lahko nanesejo na objektna stekelca. Celice/jedra se obdelajo z liznim pufrom, da se odstranijo celične in/ali jedrne membrane, in izpostavijo močnim alkalijam, npr. pH $\geq$ 13, kar povzroči odvitje DNK ter sprostitev sproščenih zank in fragmentov DNK. Jedrna DNK v agarju se nato izpostavi elektroforezi. Normalne, nefragmentirane molekule DNK ostanejo v položaju, v katerem so bile, ko je bila jedrna DNK v agarju, kakršna koli fragmentirana DNK in sproščene zanke DNK pa migrirajo proti anodi. Po elektroforezi se DNK vizualizira s pomočjo ustreznega fluorescentnega barvila. Preparate je treba analizirati z mikroskopom in popolnoma avtomatiziranimi ali polavtomatiziranimi sistemi za analizo slik. Iz obsega DNK, ki je migrirala med elektroforezo, in razdalje migracije sta razvidna količina in velikost fragmentov DNK. Za kometni preskus obstaja več končnih točk. Za oceno poškodb je priporočena vsebnost DNK v repu (odstotek DNK v repu ali odstotna intenzivnost repa) (12) (40) (41) (42). Po analizi zadostnega števila jeder se podatki analizirajo z ustreznimi metodami, da se ocenijo rezultati preskusa.

Opozoriti je treba, da je bilo spreminjanje različnih vidikov metodologije, vključno s pripravo vzorca, pogoji elektroforeze, parametri vizualne analize (npr. intenzivnost barvila, intenzivnost svetlobe mikroskopske žarnice ter uporaba mikroskopskih filtrov in dinamike kamere) in okoljskimi pogoji (npr. osvetlitev ozadja), raziskano ter da lahko vpliva na migracijo DNK (43) (44) (45) (46).

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

Vsak laboratorij mora dokazati usposobljenost za izvajanje kometnega preskusa, tako da pokaže, da lahko pridobi suspenzije s posameznimi celicami/jedri, ki so ustrezne kakovosti za vsako ciljno tkivo vsake uporabljene vrste. Kakovost preparatov bo najprej ocenjena z odstotkom DNK v repu za živali, tretirane z vehiklom, ki se uvrstijo v ponovljivo nizko območje. Iz trenutnih podatkov je razvidno, da skupinska srednja vrednost odstotka DNK v repu (ki temelji na srednji vrednosti median – glej odstavek 57 za podrobnosti o teh pojmih) pri jetrih podgan načeloma ne bi smela presegati 6 %, kar ustreza vrednostim iz validacijskega preskusa JaCVAM (12) ter drugih objavljenih podatkov in podatkov, ki so v lasti laboratorijev. Za priporočila o optimalnih ali sprejemljivih območjih za druga tkiva trenutno ni dovolj podatkov. To ne izključuje uporabe

▼M7

drugih tkiv, če je ta utemeljena. Poročilo o preskusu bi moralo zagotoviti ustrezen pregled uspešnosti kometnega preskusa teh tkiv glede na objavljeno literaturo ali podatke, ki so v lasti laboratorijev. Predvsem je zaželeno nizko območje odstotka DNK v repu v kontrolah, da se zagotovi zadostno dinamično območje za zaznavanje pozitivnega učinka. Poleg tega pa mora vsak laboratorij biti zmožen obnoviti pričakovane odzive za neposredne mutagene in promutagene z različnimi načini delovanja, kot je predlagano v preglednici 1 (odstavek 29).

Pozitivne snovi se lahko na primer izberejo iz validacijskega preskusa JaCVAM (12) ali drugih objavljenih podatkov (glej odstavek 9), kadar je to ustrezno in utemeljeno ter če povzročajo jasne pozitivne odzive v preiskovanih tkivih. Treba je dokazati tudi sposobnost zaznavanja šibkih učinkov znanih mutagenov, npr. EMS, pri nizkih odmerkih, na primer z določanjem razmerja med odzivom in odmerkom z ustreznimi številkami in razporeditvami odmerkov. Laboratorij bi se moral najprej usmeriti v dokazovanje usposobljenosti z najpogosteje uporabljenimi tkivi, npr. jetri glodalcev, pri čemer se lahko izvedejo primerjave z obstoječimi podatki in pričakovanimi rezultati (12). Istočasno se lahko zberejo podatki o drugih tkivih, npr. želodcu/dvanajsterniku/teščem črevu, krvi itd. Laboratorij mora dokazati usposobljenost za vsako posamezno tkivo vsake vrste, ki jo namerava proučiti, in prikazati, da se s tem tkivom lahko pridobi sprejemljiv pozitiven odziv z znanim mutagenom (npr. EMS).

Zbrati je treba podatke o negativnih kontrolnih vzorcih/kontrolnih vzorcih z vehiklom, da se lahko prikaže obnovljivost negativnih odzivov in zagotovi, da so bili tehnični vidiki preskusa ustrezno nadzorovani, ali ugotovi potreba po ponovni določitvi kontrolnih območij iz preteklih preskusov (glej odstavek 22).

Opozoriti je treba, da je sicer mogoče zbrati več tkiv ob obdukciji in jih obdelati za kometni preskus, vendar mora biti laboratorij usposobljen za odvzem več tkiv ene živali, s čimer zagotovi, da ni izgubljena nobena morebitna poškodba DNK in da kometni preskus ni ogrožen. Čas od evtanazije do odstranitve tkiv za tretiranje je lahko ključen (glej odstavek 44).

Med pripravami na usposobljenost za ta preskus je treba poskrbeti za dobrobit živali, zato se lahko med pripravami na usposobljenost za različne vidike preskusa uporabijo tkiva živali, ki so bile uporabljene v drugih preskusih. Poleg tega med fazami vzpostavljanja nove preskusne metode v laboratoriju morda ne bo treba izvesti celotne študije, med pridobivanjem zahtevanih spretnosti pa se lahko uporabi manj živali ali preskusnih koncentracij.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

Med preverjanjem usposobljenosti bi moral laboratorij ustvariti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da lahko določi območja ter porazdelitve pozitivnih in negativnih kontrol za ustrezna tkiva in vrste. Priporočila o tem, kako zbrati in uporabiti podatke iz preteklih preskusov (tj. merila za vključitev in izključitev podatkov v podatke iz preteklih preskusov ter merila za sprejemljivost danega preskusa), so navedena v virih (47). Na podlagi različnih tkiv in vrst ter različnih vehiklov in načinov dajanja kemikalije se lahko pridobijo različne vrednosti

▼M7

odstotka DNK v repu v negativnih kontrolah. Zato je pomembno določiti območja negativnih kontrol za vsako tkivo in vrsto. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali „X-črta“ karte (48)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“. Morda bo treba optimizirati tudi izbiro ustreznih snovi za pozitivno kontrolo, območij odmerkov in preskusnih pogojev (npr. pogojev elektroforeze) za zaznavanje šibkih učinkov (glej odstavek 17).

Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba proučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

OPIS METODE

Priprave

Izbira živalske vrste

Navadno se uporabijo običajni laboratorijski sevi zdravih mladih odraslih glodalcev (stari 6 do 10 tednov ob začetku tretiranja, čeprav so sprejemljive tudi rahlo starejše živali). Izbira vrste glodalcev mora temeljiti na (i) vrstah, uporabljenih v drugih študijah toksičnosti (da se lahko primerjajo podatki in izvajajo celovite študije), (ii) vrstah, pri katerih so v študijah rakotvornosti nastali tumorji (med raziskavami mehanizmov razvoja raka), ali (iii) vrstah z metabolizmom, ki najbolj ustreza človeškemu, če so znane. Pri tem preskusu se običajno uporabljajo podgane. Uporabijo pa se lahko tudi druge vrste, če je to etično in znanstveno utemeljeno.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

Pri glodalcih mora temperatura prostora s poskusnimi živalmi načeloma znašati 22 °C (± 3 °C). Relativna vlažnost mora načeloma znašati 50–60 % oziroma vsaj 30 % in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Če se ne pričakuje agresivno vedenje, je treba glodalce namestiti v majhnih skupinah (običajno po največ pet živali) istega spola. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno. Če je mogoče, je treba uporabiti trdna tla, saj lahko mrežasta tla povzročijo resne poškodbe (49). Okolje je treba ustrezno obogatiti.

Priprava živali

Živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Živali se označijo z edinstvenimi oznakami in vsaj pet dni pred začetkom tretiranja se morajo aklimatizirati na laboratorijske pogoje. Uporabiti je treba najmanj invazivno metodo označevanja živali z edinstvenimi oznakami. Ustrezne metode vključujejo namestitev obročkov ali trakov, vsaditev mikročipa ali biometrično identifikacijo. V teh preskusih zarezovanje ušesa ali prsta ni znanstveno utemeljeno. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati ± 20 %.

Priprava odmerkov

Trdne preskusne kemikalije je treba pred odmerjanjem živalim raztopiti ali suspendirati v ustreznih vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na njihove fizikalno-kemijskih lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola (50) (51).

Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

▼M7

Preskusni pogoji

Vehikel

Vehikel pri uporabljenih količinah odmerkov ne sme imeti toksičnih učinkov in ne sme zbujati suma, da lahko kemično reagira s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo manj znani vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s poskusnimi živalmi, načinom dajanja in končno točko. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Opozoriti je treba, da lahko nekateri vehikli (zlasti viskozni) povzročijo vnetje in povečajo ravni ozadja za prelome verig DNK na mestu kontakta, zlasti pri večkratnem dajanju.

Kontrole

Pozitivne kontrole

V tej fazi mora biti v vsak preskus običajno vključena skupina z najmanj tremi živalmi, ki jih je mogoče analizirati, istega spola ali obeh spolov, če se uporabi oba (glej odstavek 32), tretirana s snovjo za pozitivno kontrolo. V prihodnje bo morda mogoče dokazati ustrezno usposobljenost, da se zmanjša potreba po pozitivnih kontrolah. Če se uporabi več vzorčenj (npr. pri protokolu enkratnega dajanja), je treba vključiti pozitivne kontrole samo ob enem vzorčenju, vendar je treba zagotoviti uravnoteženo zasnovo (glej odstavek 48). Snovi za sočasno pozitivno kontrolo ni treba dajati na isti način kot preskusno kemikalijo, pomembno pa je, da se uporabi isti način za merjenje učinkov na mestu stika. Snovi za pozitivno kontrolo morajo pokazati, da povzročijo prelome verig DNK v vseh preiskovanih tkivih za preskusno kemikalijo, EMS pa bo verjetno najpogosteje izbrana pozitivna kontrola, saj je povzročila prelome verig DNK v vseh tkivih, ki so bila proučena. Odmerki snovi za pozitivno kontrolo morajo biti izbrani tako, da povzročajo zmerne učinke, ki kritično ocenijo uspešnost in občutljivost preskusa, ter lahko bi temeljili na krivuljah odziva na odmerek, ki jih je laboratorij določil med dokazovanjem usposobljenosti. Odstotek DNK v repu za živali sočasne pozitivne kontrole mora biti skladen s predhodno določenim območjem laboratorija za vsako posamezno tkivo in vzorčenje za to vrsto (glej odstavek 16). Primeri snovi za pozitivno kontrolo in nekatera njihova ciljna tkiva (pri glodalcih) so navedeni v preglednici 1. Snovi, ki niso navedene v preglednici 1, se lahko izberejo, če je to znanstveno utemeljeno.

Preglednica 1

Primeri snovi za pozitivno kontrolo in nekatera njihova ciljna tkiva

Snovi in št. CAS
etil metansulfonat (št. CAS 62-50-0) za katero koli tkivo
etil nitrozosečnina (št. CAS 759-73-9) za jetra in želodec, dvanajsternik ali tešče črevo
metil metansulfonat (št. CAS 66-27-3) za jetra, želodec, dvanajsternik ali tešče črevo, pljučne celice ali celice bronhoalveolarnega izpirka (BAL), ledvice, mehur, pljuča, modo in kostni mozeg/kri
N-metil-*N*′-nitro-*N*-nitrozogvanidin (št. CAS 70-25-7) za želodec, dvanajsternik ali tešče črevo
1,2-dimetilhidrazin 2HCl (št. CAS 306-37-6) za jetra in črevo
N-metil-*N*-nitrozosečnina (št. CAS 684-93-5) za jetra, kostni mozeg, kri, ledvice, želodec, tešče črevo in možgane

▼M7

Negativne kontrole

Skupino živali negativne kontrole, tretirano samo z vehiklom, drugače pa tretirano enako kot tretirane skupine, je treba vključiti v vsak preskus za vsak čas vzorčenja in vsako tkivo. Odstotek DNK v repu pri živalih negativne kontrole mora biti v predhodno določenem območju ozadja laboratorija za vsako posamezno tkivo in vsak čas vzorčenja za to vrsto (glej odstavek 16). Če podatki iz preteklih preskusov ali objavljeni podatki o kontrolah ne kažejo, da izbrani vehikel, število odmerkov ali način dajanja ne povzroča nobenih škodljivih ali genotoksičnih učinkov, je treba pred izvedbo celotne študije izvesti predhodne študije, da se določi sprejemljivost kontrole z vehiklom.

POSTOPEK

Število in spol živali

Čeprav je malo podatkov o živalih ženskega spola, ki bi omogočili primerjavo med spoloma v okviru kometnega preskusa, so si drugi genotoksični odzivi *in vivo* med živalmi moškega in ženskega spola v splošnem podobni, zato se lahko večino študij izvede na obeh spolih. Podatki, ki kažejo pomembne razlike med samci in samicami (npr. razlike v sistemski toksičnosti, metabolizmu, biološki dostopnosti itd., vključno v npr. študiji za določanje območja), spodbujajo uporabo obeh spolov. V tem primeru je morda ustrezno izvesti študijo na obeh spolih, npr. kot del toksikološke študije s ponavljajočim se odmerkom. V primeru uporabe obeh spolov je primerno uporabiti zasnovo preskusa z več dejavniki. Podrobnosti o tem, kako analizirati podatke z uporabo te zasnove, so navedene v Dodatku 2.

Velikosti skupine ob začetku študije (in med preverjanjem usposobljenosti) je treba določiti z namenom, da se zagotovi vsaj 5 živali, ki jih je mogoče analizirati, enega spola ali vsakega od spolov, če se uporabi oba, na skupino (manj za skupino sočasne pozitivne kontrole – glej odstavek 29). Kadar bi bila lahko izpostavljenost ljudi kemikalijam omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih izdelkih, je treba preskus opraviti na živalih ustreznega spola. Na podlagi zahtev za največje število živali je za študijo, izvedeno v skladu s parametri iz odstavka 33 s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolo (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz petih živali enega spola) običajno potrebnih od 25 do 35 živali.

ČASOVNI RAZPORED TRETIRANJA

Živalim je treba dati odmerke vsak dan v obdobju dveh ali več dni (tj. dva ali več odmerkov na približno 24 ur) in vzorce je treba odvzeti enkrat na 2 do 6 ur (ali ob T_{max}) po zadnjem odmerku (12). Vzorci iz daljših časovnih razporedov odmerjanja (npr. 28-dnevno vsakodnevno dajanje odmerkov) so sprejemljivi. Dokazana je bila uspešna kombinacija kometnega preskusa in preskusa mikronukleusov v eritrocitih sesalcev (10) (19). Vendar je treba skrbno obravnavati logistiko v zvezi z vzorčenjem tkiv za kometni preskus, skupaj z zahtevami za vzorčenje tkiv za drugimi vrstami toksikoloških ocen. Odvzem 24 ur po zadnjem odmerku, kar je značilno za splošno študijo toksičnosti, v večini primerov ni ustrezen (glej odstavek 40 o času vzorčenja). Uporaba drugih časovnih razporedov tretiranja in vzorčenja mora biti utemeljena (glej Dodatek 3). Lahko se na

▼M7

primer uporabi enkratni odmerek z večkratnimi vzorčenji, treba pa je opozoriti, da bo za študijo z enkratnim odmerkom treba zagotoviti več živali, saj je potrebno večkratno vzorčenje, vendar je včasih to bolj zaželeno, npr. ko preskusna kemikalija povzroči prekomerno toksičnost po ponavljajočih se odmerkih.

Ne glede na način izvedbe preskusa je ta sprejemljiv, če preskusna kemikalija povzroči pozitiven odziv, v primeru negativne študije pa je sprejemljiv, če so bili zbrani posredni ali neposredni dokazi za izpostavljenost ciljnih tkiv ali toksičnost za ta tkiva ali če je bil dosežen mejni odmerek (glej odstavek 36).

Preskusne kemikalije se lahko dajo tudi v razdeljenem odmerku, tj. v dveh tretiranjih v istem dnevu, ne več kot 2–3 ure narazen, za lažje dajanje večjih odmerkov. Pod temi pogoji je treba vzorčenje načrtovati glede na čas dajanja zadnjega odmerka (glej odstavek 40).

Velikost odmerkov

Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki iz drugih pomembnih študij, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter uporabiti isto vrsto, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji, v skladu s trenutnimi pristopi za izvajanje študij za določanje območja. S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot odmerek, ki povzroči blage toksične učinke, povezane s trajanjem študije (na primer jasne klinične znake, kot so nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za ciljno tkivo), ne pa smrti ali znakov bolečine, trpljenja ali stiske, zaradi katerih je potrebna evtanazija. Za netoksično preskusno kemikalijo z obdobjem odmerjanja, ki traja 14 dni ali več, znaša največji (mejni) odmerek 1 000 mg/kg telesne teže/dan. Za obdobja odmerjanja, krajša od 14 dni, znaša največji (mejni) odmerek 2 000 mg/kg telesne teže/dan. Te omejitve so lahko drugačne za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. farmacevtske izdelke za ljudi), za katere veljajo posebni predpisi.

Kemikalije, ki kažejo nasičenost toksikokinetičnih lastnosti ali povzročajo procese razstrupljanja, zaradi katerih se lahko po dolgotrajnem tretiranju zmanjša izpostavljenost, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in treba jih je oceniti za vsak primer posebej.

Za akutno in subakutno različico kometnega preskusa je poleg največjega odmerka (MTD, največji izvedljiv odmerek, največja izpostavljenost ali mejni odmerek) treba izbrati tudi padajoče zaporedje vsaj dveh dodatnih, ustrezno razporejenih velikosti odmerkov (po možnosti ločeni za manj kot 10) za vsako vzorčenje, da se dokaže z odmerkom povezane odzive. Uporabljene velikosti odmerkov pa bi morale načeloma zajeti tudi območje od največje do majhne toksičnosti ali netoksičnosti. Kadar se opazi toksičnost za ciljno tkivo pri vseh preskušenih velikostih odmerkov, je priporočena nadaljnja študija z netoksičnimi odmerki (glej odstavka 54 in 55). Študije, ki nameravajo bolj poglobljeno raziskati obliko krivulje odziva na odmerek, bodo morda zahtevale dodatne skupine, ki prejemajo odmerke.

Dajanje odmerkov

Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, topično podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem, intratrahealno ali z vsadkom. V vsakem primeru pa je treba način izbrati tako, da zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo na splošno ni priporočljivo, saj to ni značilen in pomemben način izpostavljenosti ljudi, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne utemeljitve (npr. za nekatere snovi za pozitivno kontrolo, namene preiskovanja ali

▼M7

nekatere droge, ki se dajejo intraperitonealno). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti poskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Kadar koli je to mogoče, je treba doseči različne velikosti odmerkov s prilagajanjem koncentracije sestave odmerka, da se zagotovi konstanten volumen glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerkov.

Čas vzorčenja

Čas vzorčenja je ključna spremenljivka, saj je določen z obdobjem, ki je potrebno, da preskusne kemikalije dosežejo najvišjo koncentracijo v ciljnem tkivu in da pride do prelomov verig DNK, ampak preden se ti prelomi odstranijo, popravijo ali vodijo v celično smrt. Obstojnost nekaterih poškodb, ki povzročijo prelome verig DNK, ki jih zazna kometni preskus, je lahko zelo kratka, vsaj pri nekaterih kemikalijah, preskušenih *in vitro* (52) (53). Če obstaja sum takšnih prehodnih poškodb DNK, je treba v skladu s tem sprejeti ukrepe za zmanjšanje izgub teh poškodb, tako da se zagotovi, da so vzorci tkiv odvzeti dovolj zgodaj, po možnosti pred privzetimi časi, ki so navedeni spodaj. Optimalni časi vzorčenja so lahko odvisni od kemikalije ali načina dajanja, kar na primer pomeni hitro izpostavljenost tkiva z intravenoznim dajanjem kemikalije ali izpostavljenost z vdihavanjem. V skladu s tem in kadar je to mogoče, je treba čas vzorčenja določiti na podlagi kinetičnih podatkov (npr. čas (T_{max}), ko je dosežena najvišja koncentracija v plazmi ali tkivu (C_{max}), ali stabilno stanje pri večkratnih odmerkih). Če kinetični podatki niso na voljo, je ustrezen kompromis za merjenje genotoksičnosti odvzem vzorca 2–6 ur po zadnjem odmerku pri dveh ali več odmerkih ali 2–6 ur in 16–26 ur po enkratnem odmerku, čeprav je treba paziti, da se nekropsija na vseh živalih opravi ob istem času po zadnjem (ali edinem) odmerku. Za izbiro ustreznih časov vzorčenja se lahko uporabijo tudi informacije o pojavljanju toksičnih učinkov v ciljnih organih (če so na voljo).

Opazovanja

Splošna klinična opazovanja, povezana z zdravjem živali, je treba opraviti in zabeležiti vsaj enkrat dnevno, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po odmerjanju (54). Vse živali je treba opazovati vsaj dvakrat na dan, da se ugotovita obolevnost in smrtnost. Pri daljših študijah je treba vse živali stehtati vsaj enkrat na teden in ob koncu preskusnega obdobja. Porabo hrane je treba meriti ob vsaki menjavi hrane in vsaj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo neletalne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja in se običajno ne uporabijo za kometno analizo.

Odvzem tkiv

Ker je mogoče proučevati indukcijo prelomov verig DNK (kometov) v skoraj vsakem tkivu, je treba izbiro tkiv, ki bodo odvzeta, jasno opredeliti ter utemeljiti z razlogom za izvedbo študije in kakršnimi koli obstoječimi podatki o procesih absorpcije, porazdelitve, presnove in izločanja (ADME), genotoksičnosti, rakotvornosti ali drugi toksičnosti za preiskovane preskusne kemikalije. Pomembni dejavniki, ki jih je treba upoštevati, morajo zajemati način dajanja (na podlagi najverjetnejših načinov izpostavljenosti ljudi), predvideno porazdelitev in absorpcijo v tkivu, vlogo metabolizma ter možni mehanizem delovanja preskusnih kemikalij. Jetra so najpogosteje proučevano tkivo in zanj obstaja največ podatkov. Če torej ni na voljo nobenih informacij o ozadju in niso opredeljena nobena

▼M7

posebna preiskovana tkiva, bi bilo vzorčenje jeter utemeljeno, saj so primarno mesto ksenobiotičnega metabolizma in pogosto močno izpostavljene tako matičnim snovem kot tudi metabolitom. V nekaterih primerih bo morda najustrezneje proučiti mesto neposrednega kontakta (na primer žlezni želodec ali dvanajsternik/tešče črevo za kemikalije, ki se dajejo oralno, ali pljuča za kemikalije, ki se vdihavajo). Izbrati je treba dodatna ali druga tkiva glede na posebne razloge za izvedbo preskusa, morda pa je uporabno proučiti več tkiv istih živali, če je laboratorij dokazal usposobljenost za ta tkiva in hkratno obravnavanje več tkiv.

Priprava vzorcev

Za procese, opisane v naslednjih odstavkih (44–49), je pomembno, da se vse raztopine ali stabilne suspenzije uporabijo do datuma izteka roka njihove uporabnosti ali se po potrebi pripravijo sveže. V naslednjih odstavkih se kot ključne spremenljivke (glej opredelitve pojmov v Dodatku 1) obravnavajo tudi čas, ki je potreben za (i) odstranitev vsakega tkiva po obdukciji, (ii) predelavo vsakega tkiva v suspenzijo s celicami/jedri in (iii) obdelavo suspenzije in pripravo preparatov, sprejemljivo trajanje vsakega od teh korakov pa bi moralo biti določeno med vzpostavljanjem metode in dokazovanjem usposobljenosti.

Živali se evtanazirajo v skladu z veljavno zakonodajo o dobrobiti živali in načeli 3R ob ustreznem času po zadnjem tretiranju s preskusno kemikalijo. Izbrana tkiva se odstranijo in secirajo, en del pa se odvzame za kometni preskus; hkrati je treba odrezati rezino istega dela tkiva in jo vstaviti v formaldehidno raztopino ali ustrezen fiksativ za morebitno histopatološko analizo (glej odstavek 55) v skladu s standardnimi metodami (12). Tkivo za kometni preskus se vstavi v pufer za mletje, spere z zadostno količino hladnega pufra za mletje, da se odstranijo ostanki krvi, in shrani v ledeno mrzlem pufru za mletje do obdelave. Izvede se lahko tudi perfuzija *in situ*, na primer za jetra ali ledvice.

Objavljene so številne metode za izolacijo celic/jeder. Te zajemajo mletje tkiv, kot so jetra in ledvice, postrganje vzorca s sluzničnih površin v primeru prebavnega trakta, homogenizacija in encimska prebava. V validacijskem preskusu JaCVAM so bile proučene samo izolirane celice, zato se v okviru določanja metode in možnosti sklicevanja na podatke preskusa JaCVAM za dokazovanje usposobljenosti priporoča uporaba izoliranih celic. Dokazano pa je bilo, da ni bilo bistvenih razlik v rezultatih preskusa, če so bile uporabljene izolirane celice ali jedra (8). Primerljivi rezultati so bili pridobljeni tudi z različnimi metodami za izolacijo celic/jeder (npr. homogenizacija, mletje, encimska prebava in filtriranje skozi mrežo) (55). Zato se lahko uporabijo izolirane celice ali izolirana jedra. Laboratorij mora skrbno oceniti in validirati metode za izolacijo posameznih celic/jeder, ki se uporabljajo za posamezna tkiva. Kot je navedeno v odstavku 40, je lahko obstojnost nekaterih poškodb, ki vodijo v prelome verig DNK, ki jih zazna kometni preskus, zelo kratka (52) (53). Ne glede na to, katera metoda se uporabi za pripravo suspenzij s posameznimi celicami/jedri, je torej pomembno, da se tkiva obdelajo čim prej po evtanaziji živali in vstavijo v pogoje, ki zmanjšajo odstranjevanje poškodb (npr. hranjenje tkiva pri nizki temperaturi). Suspenzije s celicami se morajo hraniti v ledeno mrzlih pogojih, dokler niso pripravljene za uporabo, zato da se lahko dokažejo kar najmanjše variacije med vzorci ter ustrezni odzivi pozitivnih in negativnih kontrol.

▼M7

PRIPRAVA PREPARATOV

Preparate je treba pripraviti čim prej (načeloma v roku ene ure) po pripravi posameznih celic/jeder, temperatura in čas med smrtjo živali in pripravo preparata pa morata biti skrbno nadzorovana in validirana v laboratorijskih pogojih. Volumen suspenzije s celicami, ki se jo doda v agarozo z nizkim tališčem (običajno 0,5–1,0 %) za pripravo preparatov, ne sme zmanjšati odstotka agaroze z nizkim tališčem na manj kot 0,45 %. Optimalna gostota celic bo določena na podlagi sistema za analizo slik, ki se uporablja za ocenjevanje kometov.

Liza

Pogoji lize so prav tako ključna spremenljivka in lahko vplivajo na prelome verig, ki so posledica posebnih tipov sprememb DNK (določene alkilacije DNK in adukti baz). Priporoča se torej, da se za vse preparate v preskusu ohranijo čim bolj konstantni pogoji lize. Ko so preparati pripravljeni, jih je treba potopiti v ohlajeno lizirno raztopino za vsaj eno uro (ali čez noč) pri približno 2–8 °C in zatemnjenih svetlobnih pogojih, npr. pri rumeni svetlobi (ali povsem zatemnjeno), ki preprečujejo, da bi bili izpostavljeni beli svetlobi, ki lahko vsebuje UV-komponente. Po tej inkubacijski dobi je treba preparate sprati, da se odstranijo ostanki detergenta in soli pred korakom odvitja DNK v alkalnih pogojih. To se lahko stori s prečiščeno vodo, nevtralizacijskim pufrom ali fosfatnim pufrom. Uporabi se lahko tudi elektroforezni pufer. V tem primeru se v komori za elektroforezo ohranijo alkalni pogoji.

Odvijanje DNK in elektroforeza

Preparati se naključno položijo na platformo horizontalne enote za elektroforezo, ki vsebuje dovolj elektroforezne raztopine, da so površine preparatov povsem prekrite (globina pokritja bi morala biti konsistentna v vsaki ponovitvi preskusa). Pri drugem tipu enot za elektroforezo za kometni preskus, tj. z aktivnim hlajenjem, cirkulacijo in visoko zmogljivim napajanjem, bo večje pokritje z raztopino povzročilo večji električni tok pri konstantni napetosti. Uporabiti je treba uravnoteženo zasnovo za namestitev preparatov v elektroforezni bazen, da se zmanjšajo učinki kakršnih koli trendov ali robov v bazenu in variabilnost posameznih serij, tj. v vsaki ponovitvi elektroforeze mora biti enako število preparatov z vzorcem vsake živali v študiji in vključiti je treba vzorce iz različnih skupin, ki prejemajo odmerke, ter pozitivne in negativne kontrole. Preparate je treba pustiti vsaj 20 minut, da se DNK odvije, nato pa jih izpostaviti elektroforezi pod nadzorovanimi pogoji, ki kar najbolj povečajo občutljivost in dinamično območje preskusa (tj. omogočajo sprejemljive ravni odstotka DNK v repu za negativne in pozitivne kontrole, s katerimi se kar najbolj poveča občutljivost). Raven migracije DNK je linearno povezana s trajanjem elektroforeze in tudi s potencialom (V/cm). Glede na preskus JaCVAM lahko potencial znaša 0,7 V/cm vsaj 20 minut. Trajanje elektroforeze se obravnava kot ključna spremenljivka in čas elektroforeze mora biti nastavljen tako, da optimizira dinamično območje. Daljša elektroforeza (npr. 30 ali 40 minut, da se kar najbolj poveča občutljivost) običajno povzroči močnejše pozitivne odzive z znanimi mutageni. Vendar pa lahko daljša elektroforeza povzroči tudi prekomerno migracijo v kontrolnih vzorcih. V vsakem preskusu mora biti napetost konstantna, variabilnost drugih parametrov pa mora biti znotraj ozkega in določenega območja, na primer v preskusu JaCVAM je potencial 0,7 V/cm dal začetni tok v višini 300 mA. Globino pufra je treba prilagoditi, da se doseže zahtevane pogoje, in jo vzdrževati ves čas preskusa. Zabeležiti je treba tok ob začetku in koncu elektroforeze. Optimalne

▼M7

pogoje je torej treba določiti med začetnim dokazovanjem usposobljenosti v laboratoriju v zvezi z vsakim preiskovanim tkivom. Temperatura elektroforezne raztopine med odvijanjem DNK in elektroforezo mora biti nizka, običajno 2–10 °C (10). Temperaturo elektroforezne raztopine je treba zabeležiti ob začetku odvijanja ter ob začetku in koncu elektroforeze.

Po koncu elektroforeze je treba preparate potopiti/spirati v nevtralizacijskem pufru vsaj 5 minut. Geli se lahko obarvajo in ocenijo „sveži“ (npr. v roku 1–2 dni) ali pa se dehidrirajo za poznejše ocenjevanje (npr. v roku 1–2 tednov po barvanju) (56). Vendar je treba validirati pogoje med dokazovanjem usposobljenosti ter pridobiti in ohraniti podatke iz preteklih preskusov ločeno za vsakega od teh pogojev. V primeru poznejšega ocenjevanja je treba preparate dehidrirati tako, da se jih potopi v absolutni etanol za vsaj 5 minut, posuši na zraku in nato shrani pri sobni temperaturi ali v posodi v hladilniku do ocenjevanja.

Merilne metode

Komete je treba oceniti količinsko z avtomatiziranim ali polavtomatiziranim sistemom za analizo slik. Preparati se obarvajo z ustreznim fluorescentnim barvilom, npr. SYBR Gold, Green I, propidijevim jodidom ali etidijevim bromidom, ter izmerijo pri ustrezni povečavi (npr. 200-kratni) na epifluorescenčnem mikroskopu z ustreznimi detektorji ali digitalno kamero (npr. naprava CCD).

Celice se lahko razvrstijo v tri kategorije, kot je opisano v atlasu slik kometov (57), in sicer tiste, ki jih je mogoče oceniti, tiste, ki jih ni mogoče oceniti in celice „hedgehog“ (ang. „jež“ oziroma močno poškodovane celice) (glej odstavek 56 za več podrobnosti). Odstotek DNK v repu je treba oceniti samo za celice, ki jih je mogoče oceniti (jasno razločna glava in rep brez motenj zaradi sosednjih celic), da se prepreči izkrivljene rezultate. O pogostosti celic, ki jih ni mogoče oceniti, ni treba poročati. Pogostost močno poškodovanih celic je treba določiti na podlagi vizualnega ocenjevanja (saj analiza slik ne more zlahka zaznati kometov brez jasno razločne glave) pri vsaj 150 celicah na vzorec (glej odstavek 56 za več podrobnosti) in jih ločeno opisati.

Vse preparate za analizo, vključno s tistimi s pozitivnimi in negativnimi kontrolami, je treba neodvisno označiti in oceniti „na slepo“, tako da oseba, ki beleži ugotovitve, ne pozna pogojev tretiranja. Za vsak vzorec (na tkivo na žival) je treba analizirati vsaj 150 celic (kar ne vključuje močno poškodovanih celic – glej odstavek 56). Ocenjevanje 150 celic na žival pri vsaj 5 živalih na odmerek (manj pri sočasni pozitivni kontroli – glej odstavek 29) zagotavlja ustrezno statistično moč glede na analizo, ki so jo opravili Smith idr., 2008 (5). Če se uporabljajo preparati, bi to pomenilo od 2 do 3 ocenjene preparate na vzorec, kadar se uporablja pet živali na skupino. Opazovati je treba več predelov preparata pri gostoti, ki zagotavlja, da se repi ne prekrivajo. Izogniti se je treba ocenjevanju ob robovih preparatov.

Pri kometnem preskusu se lahko prelomi verig DNK merijo z neodvisnimi končnimi točkami, kot so odstotek DNK v repu, dolžina repa in repni moment. Izvedejo se lahko vse tri meritve, če se uporablja ustrezna programska oprema za analizo slik. Za vrednotenje in razlago rezultatov pa se priporoča odstotek DNK v repu (ki mu pravimo tudi odstotna intenzivnost repa) (12) (40) (41) (42), določen pa je z intenzivnostjo fragmentov DNK v repu, ki je izražena kot odstotek skupne intenzivnosti celice (13).

▼M7

Poškodbe tkiv in citotoksičnost

Pozitivne ugotovitve pri kometnem preskusu morda niso pridobljene samo zaradi genotoksičnosti, saj lahko povečano migracijo DNK povzroči tudi toksičnost za ciljna tkiva (12) (41). Obratno pa je mogoče opaziti nizko ali zmerno citotoksičnost pri znanih genotoksinih (12), kar pomeni, da ni mogoče razlikovati med migracijo DNK, ki jo povzroča genotoksičnost, in tisto, ki jo povzroča citotoksičnost, samo s kometnim preskusom. Vendar če je opažena povečana migracija DNK, je priporočeno, da se prouči enega ali več znakov citotoksičnosti, saj lahko to pripomore k razlagi ugotovitev. Povečano migracijo DNK, če so ugotovljeni jasni dokazi za citotoksičnost, je treba razlagati previdno.

Predlagana so bila številna merila citotoksičnosti in izmed teh se kot pomembno merilo toksičnosti za tkiva obravnavajo histopatološke spremembe. S povečano migracijo DNK so povezana opažanja, kot so vnetje, infiltracija celic, apoptozne ali nekrotične spremembe, toda kot je razvidno iz validacijskega preskusa JaCVAM (12), ni na voljo nobenega dokončnega seznama histopatoloških sprememb, ki so vedno povezane s povečano migracijo DNK. Spremembe v meritvah klinične kemije (npr. AST, ALT) lahko tudi zagotovijo uporabne informacije o poškodbah tkiv, razmisli pa se lahko tudi o uporabi dodatnih kazalnikov, kot so aktivacija kaspaze, barvilo TUNEL, barvilo aneksin V itd. Vendar je število objavljenih podatkov, kjer so bili ti uporabljeni v študijah *in vivo*, omejeno in so nekateri lahko manj zanesljivi kot drugi.

Celice „hedgehog“ (ali „ježi“, oblaki, fantomske celice) so celice, ki kažejo mikroskopsko sliko, na kateri so majhna glava majhna (ali pa je ni) in veliki, razpršeni repi, ter ki se obravnavajo kot močno poškodovane celice, čeprav je etiologija „ježev“ negotova (glej Dodatek 3). Zaradi njihovega videza so meritve odstotka DNK v repu z analizo slike nezanesljive, zato je treba močno poškodovane celice oceniti ločeno. Pojavljanje močno poškodovanih celic je treba zabeležiti in ga navesti v poročilu, kakršno koli pomembno povečanje, za katero se predvideva, da ga je povzročila preskusna kemikalija, pa je treba previdno raziskati in razložiti. K takemu obravnavanju lahko pripomore poznavanje morebitnega načina delovanja preskusnih kemikalij.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Preskusna enota je žival, zato je treba podatke o posamezni živali in povzete rezultate predstaviti v obliki preglednice. Zaradi hierarhične narave podatkov je priporočeno, da se določi mediana odstotka DNK v repu za vsak preparat in izračuna srednja vrednost median za vsako žival (12). Nato se določi srednja vrednost srednjih vrednosti za posamezne živali, da se dobi skupinska srednja vrednost. Vse te vrednosti morajo biti vključene v poročilo. Uporabijo se lahko drugi pristopi (glej odstavek 53), če so znanstveno in statistično utemeljeni. Statistična analiza se lahko izvede z različnimi pristopi (58) (59) (60) (61). Pri izbiri statističnih metod, ki bodo uporabljene, je treba obravnavati potrebo po pretvorbi (npr. logaritemski ali s kvadratnim koren) podatkov in/ali prištevanje majhnega števila (npr. 0,001) k vsem vrednostim (tudi tistim, ki niso ničelne), da se zmanjšajo učinki ničelnih vrednosti celic, kot je opisano v že navedenih virih. Podrobnosti analize interakcije tretiranji in spolom, kadar se uporabita oba spola, in posledična analiza podatkov, pri kateri so ugotovljene razlike ali ne, so opisane v Dodatku 2. V poročilu je treba navesti tudi podatke o toksičnosti in kliničnih znakih.

Merila za sprejemljivost

Sprejemljivost preskusa temelji na naslednjih merilih:

a. podatki o sočasni negativni kontroli se štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 16;

▼M7

b. sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 29) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

c. analizirano je bilo ustrezno število celic in odmerkov (odstavki 52 in 36–38);

d. merila za izbor najvišjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavku 36.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

a. se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b. je povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c. je kateri koli od rezultatov zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov za dano vrsto, vehikel, način dajanja, tkivo in število odmerkov.

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči prelome verig DNK v tkivih, preiskovanih s tem preskusnim sistemom. Če je izpolnjeno samo eno od teh meril ali dva, glej odstavek 62.

Pod pogojem, da so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

a. se pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

b. se ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

c. so vsi rezultati znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov za dano vrsto, vehikel, način dajanja, tkivo in število odmerkov;

d. so pridobljeni neposredni ali posredni dokazi o izpostavljenosti ciljnih tkiv ali toksičnosti za ta tkiva.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti prelomov verig DNK v tkivih, preiskovanih s tem preskusnim sistemom.

Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

V primerih, ko odziv ni jasno negativen ali pozitiven (tj. niso izpolnjena vsa merila, navedena v odstavku 59 oziroma 60), in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultata, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali izvesti nadaljnje preiskave, če je to znanstveno utemeljeno. Uporabno bi lahko bilo ocenjevanje dodatnih celic (kadar je to ustrezno) ali izvajanje ponovitve preskusa, po možnosti z uporabo optimiziranih preskusnih pogojev (npr. razmik med odmerki, drugi načini dajanja, drugi časi vzorčenj ali druga tkiva).

Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključi, da je dvoumna.

▼M7

Za oceno biološke pomembnosti pozitivnega ali dvoumnega rezultata so zahtevane informacije o citotoksičnosti ciljnega tkiva (glej odstavka 54 in 55). Če so pozitivne ali dvoumne ugotovitve opažene samo takrat, ko obstaja jasen dokaz o citotoksičnosti, se za študijo zaključi, da je dvoumna za genotoksičnost, razen če ni na voljo dovolj informacij, ki omogočajo dokončen sklep. Kadar se v primerih negativnega rezultata študije opazijo znaki toksičnosti pri vseh preskušenih velikostih odmerkov, je morda priporočena nadaljnja študija z netoksičnimi odmerki.

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo/vehikel:

— utemeljitev izbire topila/vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;

— priprava formulacij odmerkov;

— analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije).

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev ter znanstvena in etična utemeljitev izbire;

— število, starost in spol živali;

— izvor, nastanitveni pogoji, prehrana, obogatitev okolja itd.;

— teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa, vključno z razponom, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

— podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);

▼M7

— podatki iz študije za določanje območja (če je bila izvedena);

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— utemeljitev načina dajanja;

— mesto injiciranja (za subkutane ali intravenske študije);

— metode za pripravo vzorca, kadar so na voljo, histopatološke analize, zlasti za kemikalijo s pozitivnim kometnim odzivom;

— utemeljitev izbire tkiva;

— metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;

— dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode,

— če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— podroben opis časovnih razporedov tretiranja in vzorčenja ter utemeljitev izbir (npr. toksikokinetični podatki, če so na voljo);

— metoda za blažitev bolečin, analgezija;

— metoda za evtanazijo;

— postopki za izolacijo in hrambo tkiv;

— metode za pripravo suspenzije s posameznimi celicami/jedri;

— izvor in številka serij za vse reagente (kadar je to mogoče);

— metode za vrednotenje citotoksičnosti;

— pogoji elektroforeze;

— uporabljene tehnike barvanja ter metode za ocenjevanje in merjenje kometov.

Rezultati:

— splošna klinična opazovanja, če obstajajo, pred in med preskusnim obdobjem za vsako žival;

— dokazi citotoksičnosti, če so bili pridobljeni;

▼M7

— pri študijah, ki trajajo dlje kot en teden: teža posameznih živali med študijo, vključno z območjem, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom telesne teže za vsako skupino; poraba hrane;

— razmerje med odzivom in odmerkom, če je očitno;

— za vsako tkivo/žival odstotek DNK v repu (ali druga merila, če so bila izbrana) in vrednosti mediane na preparat, srednje vrednosti na žival in srednje vrednosti na skupino;

— podatki o sočasni negativni kontroli in negativnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi/medianami in standardnimi odkloni za vsako ocenjeno tkivo;

— podatki o sočasni pozitivni kontroli in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov;

— za tkiva, ki niso jetra, krivulja odziva na odmerek z uporabo pozitivne kontrole. Ta lahko temelji na podatkih, zbranih med dokazovanjem usposobljenosti (glej odstavka 16 in 17), zajemati pa mora tudi utemeljitev s sklicevanjem na najnovejše vire v zvezi s primernostjo stopnje in razpršenostjo odzivov na kontrole za to tkivo;

— uporabljene statistične analize in metode, merila za obravnavanje odziva kot pozitivnega, negativnega ali dvoumnega;

— pogostost celic „hedgehog“ v vsaki skupini in na žival.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

Viri

VIRI

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008). Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, zv. 654/2, str. 114–32.

(2) Brendler-Schwaab, S. idr. (2005). The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, zv. 20/4, str. 245–54.

(3) Burlinson, B. idr. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, zv. 627/1, str. 31–5.

(4) Burlinson, B. (2012). The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, zv. 817, str. 143–63.

(5) Smith, C. C. idr. (2008). Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 23/3, str. 233–40.

(6) Hartmann, A. idr. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 18/1, str. 45–51.

(7) McKelvey-Martin, V. J. idr. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, zv. 288/1, str. 47–63.

(8) Tice, R. R. idr. (2000). Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 35/3, str. 206–21.

▼**M7**

(9) Singh, N. P. idr. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, zv. 175/1, str. 184–91.

(10) Rothfuss, A. idr. (2010). Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, zv. 702/1, str. 40–69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(12) OECD (2014). *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, št. 195 in 196, OECD Publishing, Pariz.

(13) Olive, P. L., J. P. Banath, R. E. Durand (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet“ assay, *Radiation Research*, zv. 122/1, str. 86–94.

(14) Tice, R. R., G. H. Strauss (1995). The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, zv. 13/1, str. 207–14.

(15) Collins, A.R. (2004). The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, zv. 26/3, str. 249–61.

(16) Rothfuss, A. idr. (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 723/2, str. 108–20.

(17) Kushwaha, S. idr. (2010). Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, zv. 58/1, str. 145–54.

(18) Vasquez, M. Z. (2010). Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, zv. 25/2, str. 187–99.

(19) Bowen, D. E. (2011). Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, zv. 722/1, str. 7–19.

(20) Recio, L. idr. (2010). Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, zv. 35/2, str. 149–62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013). Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, zv. 28/6, str. 621–3.

(22) Hartmann, A. (2004). **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, zv. 19/1, str. 51–9.

(23) Nesslany, F. (2007). *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 630/1, str. 28–41.

(24) Brendler-Schwaab, S. Y., B. A. Herbold (1997). A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 393/1–2, str. 175–8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. idr. (2011). Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 726/2, str. 175–80.

(26) Struwe, M. idr. (2008). Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, zv. 7/2, str. 240–9.

(27) Wada, K. idr. (2012). A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, str. 742/1–2, str. 26–30.

(28) Wang, A. idr. (2007). Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 634/ 1–2, str. 51–9.

(29) Burlinson, B. idr. (2007). *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 627/1, str. 31–5.

(30) Jackson, P. idr. (2012). Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, zv. 6/5, str. 486–500.

(31) Sasaki, Y. F. idr. (2000). The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, zv. 30/6, str. 629–799.

(32) Sekihashi, K. idr. (2002). Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, zv. 517/1–2, str. 53–74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009). **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, zv. 681/1, str. 3–12.

(34) Zheng, H., P. L. Olive (1997). Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, zv. 71/3, str. 275–282.

(35) Cordelli, E. idr. (2003). Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, zv. 160/4, str. 443–451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999). Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 33/2, str. 167–72.

(37) Pfuhler, S., H. U. Wolf (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 27/3, str. 196–201.

(38) Wu, J. H., N. J. Jones (2012). Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, zv. 817, str. 165–81.

(39) Spanswick, V. J., J. M. Hartley, J. A. Hartley (2010). **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, zv. 613, str. 267–282.

▼M7

(40) Kumaravel, T. S., A. N. Jha (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, zv. 605(1–2), str. 7–16.

(41) Burlinson, B. idr. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, zv. 627/1, str. 31–5.

(42) Kumaravel, T. S. idr. (2009). Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, zv. 25/1, str. 53–64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011). The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, zv. 26/6, str. 689–95.

(44) Møller, P. idr. (2010). Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, zv. 25/2, str. 109–11.

(45) Forchhammer, L. idr. (2010). Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, zv. 25/2, str. 113–23.

(46) Azqueta, A. idr. (2011). Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, zv. 724/1–2, str. 41–45.

(47) Hayashi, M. idr. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, zv. 723/2, str. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York, druga izdaja.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS št. 123)

(50) Poglavje B.8 te priloge: *Subakutna strupenost pri vdihavanju: 28-dnevna študija*.

(51) Poglavje B.29 te priloge: *Subkronična strupenost pri vdihavanju: 90-dnevna študija*.

(52) Blakey, D. H., G. R. Douglas (1984). Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, zv. 140/2–3, str. 141–45.

(53) Blakey, D. H., G. R. Douglas (1990). The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, zv. 236/1, str. 35–41.

(54) OECD (2002). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 19, OECD Publishing, Pariz.

(55) Nakajima, M. (2012). Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, zv. 34/1, str. 50–4.

(56) Hartmann, A. idr. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 18/1, str. 45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokio, Japonska.

(58) Lovell, D. P., G. Thomas, R. Dubow (1999). Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, zv. 19/2, str. 109–19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S. J., E. Agurell (2003). Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 18/2, str. 167–75.

(60) Bright, J. idr. (2011). Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, zv. 10/6, str. 485–93.

(61) Lovell, D. P., T. Omori (2008). Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, zv. 23/3, str. 171–82.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Gelska elektroforeza posamezne celice v alkalnih pogojih: občutljiva tehnika za zaznavanje poškodb primarne DNK na ravni posamezne celice/jedra.

Kemikalija: snov ali zmes.

Komet: oblika, ki jo zavzamejo nukleoidi, ko so izpostavljeni enemu elektroforeznemu polju, poimenovana zaradi svoje podobnosti kometu: glava je jedro, v repu pa je DNK, ki je v električnem polju migrirala iz jedra.

Ključna spremenljivka/parameter: spremenljivka protokola, ki lahko zaradi majhne spremembe močno vpliva na sklepno ugotovitev preskusa. Ključne spremenljivke so lahko specifične za tkivo. Ključne spremenljivke se ne smejo spreminjati, zlasti v okviru preskusa, ne da bi se pretehtal vpliv takih sprememb na odziv v preskusu, na primer kot to določajo stopnja in variabilnost pozitivnih in negativnih kontrol. V poročilu o preskusu morajo biti navedene spremembe ključnih spremenljivk, izvedene med preskusom ali v primerjavi s standardnim protokolom za laboratorij, in za vsako spremembo je treba podati utemeljitev.

Intenzivnost repa ali odstotek DNK v repu: ustreza intenzivnosti repa kometa glede na skupno intenzivnost (glava in rep). Iz te vrednosti je razvidna količina prelomov DNK, izražena v odstotkih.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼M7

Dodatek 2

ZASNOVA PRESKUSA Z VEČ DEJAVNIKI ZA OPREDELITEV RAZLIK MED SPOLOMA PRI KOMETNEM PRESKUSU *IN VIVO*

Zasnova preskusa z več dejavniki in analiza v njenem okviru

Pri tej zasnovi se preskusi vsaj 5 živali moškega in vsaj 5 živali ženskega spola pri vsaki koncentraciji, tako da se uporabi vsaj 40 živali (20 moškega in 20 ženskega spola ter ustrezne pozitivne kontrole).

Ta zasnova, ki je ena enostavnejših zasnov preskusa z več dejavniki, je enakovredna dvosmerni analizi variance, pri čemer sta glavna učinka spol in koncentracija. Podatki se lahko analizirajo z različnimi standardnimi statističnimi programskimi paketi, kot so SPSS, SAS, STATA, Genstat, ter z uporabo programskega jezika R.

Z analizo se variabilnost v naboru podatkov popolnoma razvrsti v variabilnost med spoloma, variabilnost med koncentracijami in variabilnost, povezano z medsebojnim vplivom med spoloma in koncentracijami. Vsak pogoj se preskusi glede na oceno variabilnosti med živalmi iz ponovljenih preskusov v skupinah živali istega spola pri isti koncentraciji. Celotne podrobnosti osnovne metodologije so na voljo v številnih standardnih statističnih učbenikih (glej vire) in pomoči uporabnikom, ki jo zagotavljajo statistični paketi.

Analiza se začne s pregledom pogojev medsebojnega vpliva „spol x koncentracija“ v preglednici z analizo variance ([1]). Če ni precejšnjega medsebojnega vpliva, zagotavljajo skupne vrednosti za spola ali koncentracije veljavne statistične preskuse med koncentracijami, ki temeljijo na združenem vplivu variabilnosti znotraj skupine v preglednici z analizo variance.

Analiza se nadaljuje s popolno razvrstitvijo ocene med variabilnostjo koncentracij v kontraste, s čimer se zagotovi preskus za linearne in kvadratne kontraste odzivov med različnimi koncentracijami. Če „spol x koncentracija“ kaže znaten medsebojni vpliv, se lahko ta vpliv popolnoma razvrsti v medsebojne vplive „linearni kontrast x spol“ in „kvadratni kontrast x spol“. S temi vplivi se zagotavljajo preskusi tega, ali so odzivi na koncentracije za oba spola vzporedni ali pa so odzivi med spoloma različni.

Ocena združene variabilnosti znotraj skupine se lahko uporabi za pare preskusov v zvezi z razlikami med srednjimi vrednostmi. Te primerjave se lahko naredijo med srednjimi vrednostmi za oba spola in med srednjimi vrednostmi za različne koncentracije, kot na primer za primerjave s stopnjami v negativnih kontrolah. V primerih z znatnim medsebojnim vplivom se lahko primerjajo srednje vrednosti različnih koncentracij pri istem spolu ali srednje vrednosti obeh spolov pri isti koncentraciji.

Viri

Obstajajo številni statistični učbeniki, v katerih se razpravlja o teoriji, zasnovi, metodologiji, analizi in razlagi zasnove preskusov z več dejavniki, ki se gibljejo od najenostavnejših analiz z dvema dejavnikoma do bolj zapletenih oblik, uporabljenih v metodologiji zasnove poskusov. Naslednji seznam ni izčrpen. V nekaterih knjigah so obdelani primeri primerljivih zasnov, ki imajo v nekaterih primerih kodo za izvajanje analize z uporabo različnih programskih paketov.

([1]) Statistiki, ki uporabljajo pristop modeliranja, kot so splošni linearni modeli, lahko analizo začnejo na drugačen, a primerljiv način, vendar ne bodo nujno izpeljali običajne preglednice z analizo variance, ki sega v čas algoritemskih pristopov k izračunavanju statističnih podatkov, razvitih v predračunalniški dobi.

▼**M7**

(1) Box, G. E. P, Hunter, W. G. in Hunter, J. S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box, G. E. P. in Draper, N. R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C. P. in Davey, A. J. H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D. C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B. J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C. F. J & Hamada, M. S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Dodatek 3

TRENUTNE OMEJITVE PRESKUSA

V okviru trenutnega znanja je s kometnim preskusom *in vivo* povezanih več omejitev. Te omejitve naj bi se zmanjšale ali ožje opredelile na podlagi vedno več izkušenj z uporabo preskusa za reševanje varnostnih vprašanj v regulativnem okviru.

1. Nekatere vrste poškodb DNK so lahko kratkotrajne, tj. se morda popravijo prehitro, da bi jih bilo mogoče opaziti v 24 urah ali več po zadnjem odmerku. Ne obstaja znan seznam vrst kratkotrajnih poškodb ali kemikalij, ki verjetno povzročajo to vrsto poškodbe, niti ni znano, v kakšnem časovnem obdobju je to vrsto poškodbe mogoče zaznati. Optimalni čas vzorčenja je lahko odvisen tudi specifičen za kemikalijo ali način dajanja in ga je treba določiti na podlagi kinetičnih podatkov (na primer čas T_{max}, ob katerem je dosežena najvišja koncentracija v plazmi ali tkivu), če so taki podatki na voljo. Večina validacijskih študij, ki podpirajo to preskusno metodo, je določilo nekropsijo 2 ali 3 ure po zadnjem odmerku. Večina študij v objavljenih virih opisuje dajanje zadnjega odmerka od 2 do 6 ur pred žrtvovanjem. Te izkušnje so bile torej uporabljene kot podlaga za priporočilo za preskusno metodo, in sicer da je treba zadnji odmerek dati ob določenem času med 2 in 6 urami pred nekropsijo, če ni podatkov, ki bi priporočali drugačen postopek.

2. Ni znanih podatkov študij, ki bi proučile občutljivost preskusa za zaznavanje kratkotrajnih poškodb DNK po dajanju odmerka s hrano ali pitno vodo v primerjavi z dajanjem odmerka z gavažo. Poškodbe DNK so bile ugotovljene po dajanju odmerka s hrano in pitno vodo, je pa sorazmerno malo takih poročil v primerjavi z veliko več izkušnjami z dajanjem odmerka z gavažo in intraperitonealno injekcijo. Zato je občutljivost preskusa morda manjša za kemikalije, ki povzročijo kratkotrajne poškodbe in se dajejo s hrano ali pitno vodo.

3. Medlaboratorijske študije so bile izvedene samo na jetrih in želodcu, na drugih tkivih pa ne, zato niso opredeljena nobena priporočila o tem, kako doseči občutljiv in ponovljiv odziv na drugih tkivih, ne samo na jetrih, kot so na primer pričakovana območja pozitivne in negativne kontrole. Za jetra tudi ni bilo mogoče doseči soglasja o opredelitvi spodnje meje za vrednost negativne kontrole.

4. Čeprav je zavajajoč učinek citotoksičnosti *in vitro* predstavljen v več publikacijah, je zelo malo objavljenih podatkov *in vivo*, zato ni bilo mogoče priporočiti nobenega merila za citotoksičnost. S povečano migracijo DNK so povezane histopatološke spremembe, kot so vnetje, infiltracija celic, apoptozne ali nekrotične spremembe, toda, kot je razvidno iz validacijskega preskusa JaCVAM (OECD 2014), te spremembe ne pomenijo vedno pozitivnih ugotovitev pri kometnem preskusu, zato ni na voljo nobenega dokončnega seznama histopatoloških sprememb, ki so vedno povezane s povečano migracijo DNK. Celice „hedgehog“ (ali „ježi“, oblaki, fantomske celice) so že bili predlagani kot kazalnik citotoksičnosti, vendar je etiologija teh celic negotova. Po nekaterih podatkih jih lahko povzroči citotoksičnost, povezana s kemikalijo, poškodbe zaradi mehanskih ali encimskih postopkov, ki so nastale med pripravo vzorca (Guerard idr., 2014), in/ali bolj skrajen učinek genotoksičnosti preskusne kemikalije. Drugi podatki pa naj bi kazali, da nastanejo zaradi močnih, vendar morda popravljivih, poškodb DNK (Lorenzo idr. 2013).

▼M7

5. Tkiva ali jedra celic so bila uspešno zamrznjena za poznejšo analizo. To običajno omogoči merljiv učinek na odziv na vehikel in pozitivno kontrolo (Recio idr., 2010; Recio at al., 2012; Jackson at al., 2013). Pri uporabi zamrznitve mora laboratorij dokazati usposobljenost za metodologije zamrzovanja ter potrditi sprejemljiva nizka območja odstotka DNK v repu v ciljnih tkivih živali, tretiranih z vehiklom, in dokazati, da je pozitivne odzive še vedno mogoče zaznati. V virih je opisana zamrznitev tkiv z uporabo različnih metod. Vendar trenutno ni soglasja o tem, kako je najbolje zamrzniti in odtaliti tkiva ter kako oceniti, ali lahko morebiten spremenjen odziv vpliva na občutljivost preskusa.

6. Nedavna raziskovanja kažejo, da naj bi se seznam ključnih spremenljivk še naprej krajšal, parametri ključnih spremenljivk pa natančneje opredelili (Guerard idr. 2014).

Viri

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014). Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, zv. 55/2, str. 114–21.

(2) Jackson, P. idr. (2013). Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, zv. 28/6, str. 699–707.

(3) Lorenzo, Y. idr. (2013). **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,** *Mutagenesis*, zv. 28/4, str. 427–32.

(4) OECD (2014). *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, št. 195 in 196, OECD Publishing, Pariz.

(5) Recio L., Hobbs C., Caspary W., Witt K. L. (2010). Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35: 149–62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼**M8**

B.63 **PRESEJALNI PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 421 (2016). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno pregledujejo ob upoštevanju znanstvenega napredka. Prvotna smernica za presejalni preskus 421 je bila sprejeta leta 1995 na podlagi protokola za „predhodni presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje“, o katerem se je razpravljalo na dveh strokovnih srečanjih, in sicer leta 1990 v Londonu (1) in leta 1992 v Tokiu (2).

2. Ta preskusna metoda je bila posodobljena z ustreznimi končnimi točkami za endokrine motilce kot nadaljnji ukrep v okviru prednostne dejavnosti, ki jo je OECD začela izvajati leta 1998, da bi pregledala obstoječe smernice za preskušanje ter pripravila nove smernice za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih endokrinih motilcev (3). Smernica OECD za preskušanje 407 (28-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih, poglavje B.7 te priloge) je bila na primer leta 2008 izboljšana s parametri, primernimi za zaznavanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Namen posodobitve Smernice za preskušanje 421 je bil, da se v smernice za presejalno preskušanje vključijo nekatere ustrezne končne točke za endokrine motilce, kadar obdobja izpostavljenosti zajemajo nekatera občutljiva obdobja med razvojem (pred rojstvom ali malo po rojstvu).

3. Izbrane dodatne ustrezne končne točke za endokrine motilce, ki so tudi del Smernice za preskušanje 443 (razširjene študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji, poglavje B.56 te priloge), so bile v Smernico za preskušanje 421 vključene na podlagi študije izvedljivosti, s katero so se obravnavala znanstvena in tehnična vprašanja, povezana z njihovo vključitvijo, ter morebitne prilagoditve načrta preskusa, potrebne za njihovo vključitev (4).

4. Ta preskusna metoda naj bi zagotovila omejene informacije v zvezi z učinki preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev. Ni alternativa obstoječim preskusnim metodam B.31, B.34, B.35 ali B.56 niti jih ne nadomešča.

ZAČETNI PREUDARKI

5. Ta metoda presejalnega preskusa se lahko uporablja za zagotovitev začetnih informacij o morebitnih učinkih na razmnoževanje in/ali razvoj bodisi v zgodnji fazi ocenjevanja toksikoloških lastnosti kemikalij bodisi v zvezi s kemikalijami, ki vzbujajo zaskrbljenost. Uporabi se lahko tudi v okviru sklopa začetnih presejalnih preskusov za obstoječe kemikalije, za katere je na voljo malo ali nič toksikoloških informacij, kot študija za določanje območja odmerka za obsežnejše razmnoževalne/razvojne študije ali če se zdi pomembna kako drugače. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in preudarke iz Smernice OECD 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (5).

▼**M8**

6. Ta preskusna metoda ne zagotavlja popolnih informacij o vseh vidikih razmnoževanja in razvoja. Zlasti zagotavlja samo omejene načine, kako po rojstvu zaznavati pojavne oblike izpostavljenosti pred rojstvom ali učinke, ki jih lahko povzroči izpostavljenost po rojstvu. Zaradi (med drugim) razmeroma majhnega števila živali v skupinah, ki prejemajo odmerke, selektivnosti končnih točk in kratkotrajnosti študije ta metoda ne zagotavlja dokazov za dokončne trditve o neobstoju učinkov. Če ni podatkov iz drugih preskusov toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, so poleg tega pozitivni rezultati koristni za začetno oceno nevarnosti in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časovnim okvirom dodatnega preskušanja.

7. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (6). V tem temeljnem okviru je izboljšana Smernica OECD za preskušanje 421 vključena na ravni 4 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o škodljivih učinkih na ustrezne končne točke za endokrini sistem. Vendar zgolj endokrinega signala ni mogoče šteti za zadosten dokaz, da je preskusna kemikalija endokrini motilec.

8. Pri tej preskusni metodi je predvideno oralno dajanje preskusne kemikalije. Če se uporabijo drugi načini izpostavljenosti, so morda potrebne prilagoditve.

9. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

10. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

11. Preskusna kemikalija se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke najmanj štiri tedne in do vključno dneva pred predvideno usmrtitvijo (to vključuje vsaj dva tedna pred parjenjem, obdobje parjenja in približno dva tedna po parjenju). Glede na omejeno obdobje odmerjanja pred parjenjem pri samcih plodnost morda ni posebno občutljiv kazalnik toksičnosti za moda. Zato je bistven podroben histološki pregled mod. Kombinacija dvotedenskega obdobja odmerjanja pred parjenjem in poznejših opazovanj parjenja/plodnosti s skupno vsaj štiritedenskim obdobjem odmerjanja, ki mu sledi podroben histopatološki pregled spolnih žlez samcev, se šteje za zadostno, da se lahko zazna večina učinkov na plodnost pri samcih in spermatogenezo.

12. Samicam je treba dajati odmerke med celotno študijo. To vključuje dva tedna pred parjenjem (da se zajameta vsaj dva popolna pojatvena cikla), različen čas do spočetja, trajanje brejosti in vsaj 13 dni po kotitvi, do vključno dneva pred predvideno usmrtitvijo.

13. Trajanje študije (po aklimatizaciji in oceni pojatvenega cikla pred odmerjanjem) je odvisno od delovanja samice in traja približno 63 dni (vsaj 14 dni pred parjenjem, (do) 14 dni parjenja, 22 dni brejosti, 13 dni laktacije).

▼M8

14. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusnim obdobjem poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in obducirajo.

OPIS METODE

Izbira živalskih vrst

15. Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljale podgane. Če se parametri, določeni pri tej preskusni metodi, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. V mednarodnem validacijskem programu za zaznavanje endokrinih motilcev v Smernicah OECD za preskušanje 407 (ustreza poglavju B.7 te priloge) je bila podgana edina uporabljena vrsta. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Uporabiti je treba zdrave živali, ki se še niso parile in niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Opredeliti je treba vrsto, sev, spol, težo in starost preskusnih živali. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati 20 % povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo ali študijo celotne generacije, je priporočljivo, da se v obeh študijah uporabijo živali iz istega seva in vira.

Nastanitev in hranjenje

16. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna s svetlobnim ciklom 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi.

17. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Breje samice morajo biti v svojih kletkah in imeti na voljo material za izdelavo gnezda. Samice v laktaciji so v svojih kletkah skupaj z mladiči.

18. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

Priprava živali

19. Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in zadržijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

Priprava odmerkov

20. Priporoča se, da se preskusna kemikalija daje oralno, razen če se šteje drug način dajanja za primernejšega. Če se izbere oralni način, se preskusna kemikalija običajno daje z gavažo, lahko pa tudi s hrano ali pitno vodo.

▼M8

21. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem vehiklu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/emulzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih vehiklih. V primeru vehiklov, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega vehikla. Določiti je treba stabilnost in homogenost preskusne kemikalije v vehiklu.

POSTOPEK

Število in spol živali

22. Priporočljivo je, da se v vsaki skupini začne z vsaj 10 samci in 12–13 samicami. Pri samicah se pred izpostavitvijo oceni pojatvena cikličnost; živali, ki nimajo značilnih 4–5-dnevnih ciklusov, se ne vključijo v študijo; zato se priporočajo dodatne samice za zagotovitev, da je v vsaki skupini 10 samic. Razen v primeru izrazitih toksičnih učinkov naj bi se tako dobilo vsaj 8 brejih samic na skupino, kar je običajno najnižje sprejemljivo število brejih samic na skupino. Cilj je dobiti dovolj brejih samic in mladičev, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala preskusne kemikalije za vplivanje na plodnost, brejost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F_1 od spočetja do 13. dne po skotitvi.

Odmerjanje

23. Običajno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in eno kontrolno skupino. Velikosti odmerkov lahko temeljijo na informacijah iz preskusov akutne toksičnosti ali rezultatih študij s ponavljajočimi se odmerki. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja vehikel, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino vehikla.

24. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o toksičnosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na voljo. Upoštevati je treba tudi, da lahko obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebrejimi živalmi. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, da se povzročijo toksični učinki, ne pa tudi pogin ali hudo trpljenje. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od odmerjanja, in ugotovi najmanjša velikost odmerka, pri kateri ni opaženih škodljivih učinkov (NOAEL). Za določanje padajočih velikosti odmerkov je velikokrat najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerjanji pa je pogosto primerneje dodati še četrto preskusno skupino.

25. Če se ugotovijo splošna toksičnost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na endokrine občutljive končne točke.

Mejni preskus

26. Če pri oralni študiji pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne nastanejo opazni toksični učinki in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh toksičnost ni pričakovana, popolna študija z več velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega oralnega odmerka. Pri drugih načinih dajanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije pogosto določajo največjo dosegljivo koncentracijo.

▼M8

Dajanje odmerkov

27. Živalim se dajejo odmerki preskusne kemikalije sedem dni na teden. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.

28. Pri preskusnih kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali.

Načrt za poskus

29. Odmerjanje obema spoloma se mora začeti vsaj 2 tedna pred parjenjem, potem ko so se živali aklimatizirale vsaj pet dni in so bile samice pregledane, ali imajo normalen pojatveni ciklus (v dvotedenskem obdobju pred tretiranjem). Študija mora biti načrtovana tako, da se ocenjevanje pojatvenega ciklusa začne kmalu potem, ko živali dosežejo polno spolno zrelost. To se lahko pri različnih sevih podgan v različnih laboratorijih nekoliko razlikuje, npr. pri podganah seva Sprague Dawley se zgodi pri 10 tednih starosti, pri podganah seva Wistar pa pri približno 12 tednih starosti. Matere s potomci je treba usmrtiti 13. dan po porodu ali kmalu zatem. Dan rojstva (tj. ko je končana kotitev) je opredeljen kot poporodni dan 0. Samice, za katere ni dokazov o kopulaciji, se usmrtijo 24–26 dni po zadnjem dnevu obdobja parjenja. Odmerjanje se pri obeh spolih nadaljuje še v obdobju parjenja. Po obdobju parjenja je treba samcem dajati odmerke še vsaj toliko časa, dokler ni doseženo najkrajše skupno obdobje odmerjanja 28 dni. Nato se usmrtijo ali pa se ohranijo pri življenju in se jim še naprej dajejo odmerki za morebitno drugo parjenje, če se šteje za ustrezno.

30. Dnevno dajanje odmerkov starševskim samicam se mora nadaljevati skozi celotno brejost in vsaj do vključno 13. dne po porodu ali dneva pred usmrtitvijo. Pri študijah, pri katerih se preskusna kemikalija prejema z vdihavanjem ali po dermalni poti, se mora odmerjanje nadaljevati vsaj do vključno 19. dne brejosti, pri čemer je treba odmerjanje znova začeti takoj, ko je to mogoče, in najpozneje 4. dne po porodu.

31. Diagram načrta poskusa je prikazan v Dodatku 2.

Postopek parjenja

32. Običajno je treba pri tej študiji uporabiti parjenje 1: 1 (en samec na eno samico). Izjeme so možne v primeru občasnih poginov samcev. Samica mora biti nastanjena z istim samcem, dokler ni dokazov o kopulaciji ali dokler ne pretečeta dva tedna. Vsako jutro je treba samice pregledati za prisotnost semenčic ali vaginalnega zamaška. Dan brejosti 0 je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (opažen je vaginalni čep ali semenčice). Če parjenje ni uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine.

▼M8

Velikost legla

33. Četrti dan po skotitvi se lahko velikost posameznega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, tako da so po možnosti v vsakem leglu štirje ali pet mladičev vsakega spola, odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan. Dvema od odvečnih mladičev je treba odvzeti vzorce krvi, jih združiti in uporabiti za določitev ravni T4 v serumu. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže ali zadnjično-genitalne razdalje, ni ustrezno. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi bili v vsakem leglu štirje ali pet mladičev na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer šest samcev in štiri samice). Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev (8 ali 10 mladičev/leglo). Če je nad ciljno vrednostjo za izločitev na voljo samo en mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

34. Če velikost legla ni prilagojena, se 4. dan po porodu usmrtita dva mladiča na leglo, ki se jima odvzamejo vzorci krvi za meritve serumskih koncentracij hormona ščitnice. Če je mogoče, naj bosta dva mladiča na leglo samici, da se mladi samci prihranijo za ocene razvitosti prsnih bradavic, razen če z izločitvijo teh mladičev ne bi bilo več na voljo samic za oceno ob usmrtitvi. Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev 8 ali 10 mladičev na leglo (odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan). Če je glede na običajno velikost legla na voljo en sam mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

Opazovanja živih živali

Klinična opazovanja

35. Med preskusnim obdobjem so splošna klinična opazovanja potrebna vsaj enkrat na dan, če se opazijo znaki toksičnosti, pa tudi pogosteje. Po možnosti jih je treba opraviti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Evidentirati je treba pomembne vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake toksičnosti, vključno s smrtnostjo. Pri znakih toksičnosti je treba evidentirati njihov čas nastanka, jakost in trajanje.

Telesna teža in poraba hrane/vode

36. Samce in samice je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, nato pa vsaj enkrat tedensko in ob usmrtitvi. Med brejostjo je treba samice stehtati na dneve 0, 7, 14 in 20, v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj 4. in 13. dan po porodu. O teh opažanjih je treba posebej poročati za vsako odraslo žival.

37. Porabo hrane je treba v obdobju pred parjenjem, med brejostjo in laktacijo meriti vsaj enkrat na teden. Med parjenjem merjenje porabe hrane ni obvezno. V teh obdobjih je treba meriti tudi porabo vode, če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo.

Pojatveni ciklusi

38. Pojatvene cikluse je treba spremljati pred začetkom tretiranja, da se za študijo izberejo samice z rednimi ciklusi (glej odstavek 22). Dnevno je treba spremljati tudi vaginalne brise, in sicer od začetka obdobja tretiranja do dokazov o parjenju. Če obstajajo pomisleki glede učinkov akutnega stresa, zaradi katerih bi se lahko z začetkom odmerjanja spremenili pojatveni ciklusi, lahko laboratoriji preskusne živali izpostavijo za 2 tedna in nato

▼M8

odvzamejo vaginalne brise, da dnevno spremljajo pojatveni ciklus vsaj dva tedna v obdobju pred parjenjem, pri čemer se spremljanje nadaljuje, dokler ni dokazov o parjenju. Med jemanjem celic nožnice/maternične vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do psevdogravidnosti (7) (8).

Parametri pri potomcih

39. Evidentirati je treba trajanje brejosti, ki se računa od dneva brejosti 0. Vsako leglo je treba pregledati čim prej po skotitvi, da se ugotovijo število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih in spačkov (mladičev, ki so znatno manjši od ustreznih kontrolnih mladičev) ter večje nepravilnosti.

40. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, legla pa je treba stehtati v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj 4. in 13. dan po porodu. Poleg opažanj, opisanih v odstavku 35, je treba evidentirati vsako nenavadno vedenje potomcev.

41. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti na isti poporodni dan, in sicer med poporodnim dnem 0 in 4. dnem po porodu. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (9). Število prsnih bradavic/areol pri mladih samcih je treba prešteti 12. ali 13. dan po porodu, kot je priporočeno v Smernici OECD 151 (10).

Klinična biokemija

42. Vzorci krvi z določenega mesta se vzamejo po naslednjem razporedu:

— vsaj dvema mladičema na leglo 4. dan po porodu, če število mladičev to omogoča (glej odstavka 33 in 34);

— vsem materam in vsaj dvema mladičema na leglo ob usmrtitvi 13. dan ter

— vsem odraslim samcem ob usmrtitvi.

Vsi vzorci krvi se shranijo v ustreznih pogojih. V vzorcih krvi mladičev, starih 13 dni, in odraslih samcev se ocenijo serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4). Dodatna ocena T4 v vzorcih krvi mater in mladičev, starih 4 dni, se izvede po potrebi. Po potrebi se lahko izmerijo tudi drugi hormoni. Za analize hormonov ščitnice se lahko kri mladičev združi po leglih. Hormona ščitnice (T4 in TSH) je treba po možnosti meriti „skupaj“.

43. Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:

— čas usmrtitve zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva;

— način usmrtitve, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov;

— preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.

▼M8

44. Vzorce plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne.

Patologija

Makroskopska obdukcija

45. Ob usmrtitvi ali poginu med študijo je treba odrasle živali makroskopsko pregledati za kakršne koli anomalije ali patološke spremembe. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Evidentirati je treba število ugnezditev. Zjutraj na dan obdukcije je treba pregledati vaginalne brise, da se ugotovi faza pojatvenega ciklusa in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami jajčnikov.

46. Z mod, nadmodkov ter prostate in semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami kot celote je treba pri vseh odraslih samcih, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato čim prej po disekciji izmeriti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Poleg tega lahko teža neobveznih organov vključuje sistem mišice levator ani z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi in glavico penisa pri samcih ter oba jajčnika (mokra teža) in maternico (vključno z materničnim vratom) pri samicah; če se navedeno vključi, je treba te teže zbrati čim prej po disekciji.

47. Pri poginulih mladičih in mladičih, usmrčenih 13. dan po porodu ali kmalu zatem, je treba skrbno pregledati vsaj zunanjost, da se odkrijejo večje nepravilnosti. Posebno pozornost je treba posvetiti zunanjim reproduktivnim genitalijam, pri katerih je treba pregledati, ali so se pojavili znaki spremenjenega razvoja. Na 13. dan je treba shraniti ščitnico enega mladega samca in ene mlade samice na leglo.

48. Pri vseh odraslih živalih je treba shraniti jajčnike, moda, pomožne spolne organe (maternico in maternični vrat, nadmodke, prostato, semenska mešička s koagulacijskimi žlezami), ščitnico in vse organe, na katerih se kažejo makroskopske lezije. Za redni pregled mod in nadmodkov fiksacija v formalinu ni priporočljiva. Sprejemljiva metoda za ta tkiva je uporaba Bouinovega ali prilagojenega Davidsonovega fiksativa (11). Tunico albugineo je dovoljeno nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo.

Histopatologija

49. Podrobno histopatološko preiskavo je treba izvesti na jajčnikih, modih in nadmodkih (s posebnim poudarkom na fazah spermatogeneze in histopatologiji intersticijske celične strukture mod) živali iz skupine z največjim odmerkom in kontrolne skupine. Drugi shranjeni organi, vključno s ščitnicami mladičev in odraslih živali, se lahko pregledajo po potrebi. Teža ščitnice se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo. Preiskave je treba razširiti na živali iz skupin z drugimi odmerjanji, če se v skupini z največjim odmerkom opazijo spremembe. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih o histopatologiji (11).

▼M8

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

50. Podatke je treba navesti za vsako žival posebej. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, poginulih med preskusom ali usmrčenih iz humanih razlogov, čas pogina ali usmrtitve iz humanih razlogov, število plodnih živali, število brejih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanjem in resnostjo morebitnih toksičnih učinkov, vrsto histopatoloških sprememb in vse ustrezne podatke o leglu. Format zbirnega poročila v obliki preglednice, ki se je izkazal kot zelo koristen za oceno učinkov na razmnoževanje/razvoj, je naveden v Dodatku 3.

51. Zaradi omejenega obsega študije imajo statistične analize v obliki preskusov „pomembnosti“ omejeno vrednost za številne končne točke, zlasti končne točke razmnoževanja. Če se uporabijo statistične analize, mora biti izbrana metoda ustrezna za porazdelitev preučevane spremenljivke, izbrati pa jo je treba pred začetkom študije. Statistična analiza zadnjično-genitalne razdalje in razvitosti prsnih bradavic mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upoštevajo učinki legla. Kadar je ustrezno, je enota analize leglo. Statistična analiza telesne teže mladičev mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upošteva velikost legla. Zaradi majhnosti skupine je lahko uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov (npr. za velikost legla), če so na voljo, prav tako koristna kot pomoč pri razlagi študije.

Vrednotenje rezultatov

52. Ugotovitve te toksikološke študije je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, obdukcijo in mikroskopske ugotovitve. Vrednotenje vključuje razmerje med odmerkom preskusne kemikalije in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z makroskopskimi lezijami, ugotovljenimi ciljnimi organi, neplodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivostjo reproduktivnosti in legla, spremembami telesne mase, učinki na smrtnost in drugimi toksičnimi učinki.

53. Zaradi kratkotrajnega tretiranja samca je treba pri ocenjevanju učinkov na razmnoževanje pri samcih histopatologijo mod in nadmodkov obravnavati skupaj s podatki o plodnosti. Kot pomoč pri razlagi študije je lahko koristna tudi uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov, ki se nanašajo na razmnoževanje/razvoj (npr. za velikost legla, zadnjično-genitalno razdaljo, razvitost prsnih bradavic, ravni T4 v serumu), če so na voljo.

54. Za kontrolo kakovosti se predlagata zbiranje podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z zaznavanjem endokrinih motilcev. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se vrednotijo dejanske študije.

Poročilo o preskusu

55. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

▼**M8**

Snov iz ene sestavine

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Vehikel (po potrebi):

— utemeljitev izbire vehikla, če ta ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev;

— število, starost in spol živali;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— teža posamezne živali na začetku preskusa.

— utemeljitev vrste, če to ni podgana.

Preskusni pogoji:

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— podrobni podatki o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženih koncentracijah, stabilnosti in homogenosti pripravka;

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— podroben opis postopka naključnega izbiranja mladičev za izločitev, če se izločijo.

Rezultati:

— telesna teža/spremembe telesne teže;

— poraba hrane, in če je na voljo, poraba vode;

— podatki o toksičnem odzivu po spolu in odmerku, vključno s plodnostjo in brejostjo, ter drugi znaki toksičnosti;

— trajanje brejosti;

— toksični ali drugi učinki na razmnoževanje, potomce, poporodno rast itd.;

— vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o popravljivosti);

— število odraslih samic z normalnim ali nenormalnim pojatvenim ciklusom in trajanje ciklusa;

— število živorojenih in izgub po ugnezditvi;

— podatki o telesni teži mladičev;

— zadnjično-genitalna razdalja vseh mladičev (in telesna teža na dan meritve zadnjično-genitalne razdalje);

▼M8

— razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih;

— ravni ščitničnega hormona pri mladičih, starih 13 dni, in odraslih samcih (ter materah in mladičih, starih 4 dni, če se merijo);

— število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami, splošna ocena zunanjih genitalij, število spačkov;

— čas pogina med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka študije;

— število ugnezditev, velikost legla in teže legla ob evidentiranju;

— telesna teža ob usmrtitvi in podatki o teži organov za starševske živali;

— izsledki obdukcije;

— podroben opis ugotovitev histopatoloških preiskav;

— podatki o absorpciji (če so na voljo);

— statistična obdelava rezultatov, če je to primerno.

Obravnava rezultatov.

Sklepne ugotovitve.

Razlaga rezultatov

56. Študija bo zagotovila vrednotenje toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, povezane z dajanjem ponovljenih odmerkov (glej odstavka 5 in 6). Pokazala bo lahko na potrebo po dodatnih preiskavah in zagotovila smernice za zasnovo poznejših študij. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in razvoju glej Smernico OECD 43 (12). Smernica OECD 106 o histološkem vrednotenju preskusov endokrinega in razmnoževalnega sistema pri glodavcih (11) zagotavlja informacije o pripravi in ocenjevanju (endokrinih) organov in vaginalnih brisov, ki so lahko koristne za to smernico za preskušanje.

VIRI

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.–29. oktober 1992. Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. marec 1998. Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 217), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(7) Goldman, J. M., Murr, A. S., Buckalew, A. R., Ferrell, J. M., in Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, del B, 80 (2), 84–97.

(8) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons, v: Auston, C. R., in Short, R. V. (ur.). Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan, R. H., Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., in Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 151), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 106), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 43), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼**M8**

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV (GLEJ TUDI SMERNICO OECD 150 (6))

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17 β-estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. $T_{3)}$ v sesalskem organizmu.

Kemikalija je snov ali zmes.

Toksičnost za razvoj: pojavna oblika toksičnosti za razmnoževanje, ki se pri potomcih kaže kot pred-, ob- in poporodna strukturna ali funkcionalna motnja.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Očitna toksičnost je splošen izraz, ki opisuje jasne znake toksičnosti po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zadostovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov toksičnosti in verjetno smrt.

Škodovanje plodnosti pomeni motnje razmnoževalnih funkcij ali sposobnosti za razmnoževanje pri samcih ali samicah.

Toksičnost pri materi: škodljivi učinki na breje samice, ki se pojavijo bodisi specifično (neposredni učinek) bodisi nespecifično (posredni učinek).

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (no-observed-adverse-effect level). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogeni hormon (npr. 17 β-estradiola) v sesalskem organizmu.

Toksičnost za razmnoževanje pomeni škodljive učinke na potomstvo in/ali poškodovane razmnoževalne funkcije ali prizadete sposobnosti za razmnoževanje pri samcih in samicah.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

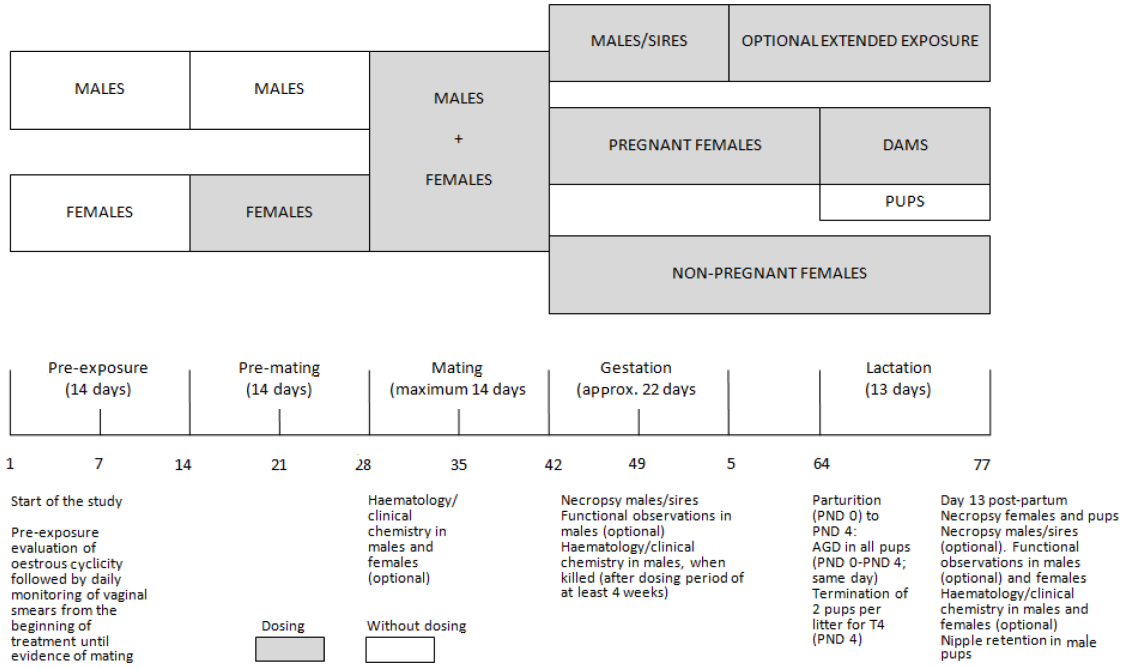
Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. $T_{3)}$ v sesalskem organizmu.

Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

▼**M8**

Dodatek 2

DIAGRAM NAČRTA ZA POSKUSE Z NAVEDBO NAJDALJŠEGA TRAJANJA ŠTUDIJE NA PODLAGI POLNEGA 14-DNEVNEGA OBDOBJA PARJENJA



▼**M8**

Dodatek 3

ZBIRNO POROČILO O UČINKIH NA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ V OBLIKI PREGLEDNICE

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Odmerjanje (enote)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Začetni pari (N)					
Ciklus estrusa (vsaj srednja dolžina in pogostnost nerednih ciklusov)					
Samice, ki kažejo znake kopulacije (N)					
Samice, ki so dosegle brejost (N)					
Dnevi spočetja 1–5 (N)					
Dnevi spočetja 6–... ([1]) (N)					
Brejost≤ 21 dni (N)					
Brejost = 22 dni (N)					
Brejost ≥ 23 dni (N)					
Matere z živimi novorojenimi mladiči (N)					
Matere z živimi mladiči 4. dan po porodu (N)					
Ugnezditve/mati (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati ob rojstvu (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati 4. dan (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) ob rojstvu (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) 4. dan (srednja vrednost)					
Teža legla ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža legla 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob meritvi zadnjično-genitalne razdalje (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah)					

▼**M8**

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Odmerjanje (enote)	0 (kontrola)	…	…	…	…
Zadnjično-genitalna razdalja pri mladičih na isti dan po porodu, od rojstva do 4. dne (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah, označi dan po porodu)					
Teža mladičev 4. dan (srednja vrednost)					
Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih 13. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev 13. dan (srednja vrednost)					
MLADIČI Z ANOMALIJAMI					
Matere z 0					
Matere z 1					
Matere z ≥ 2					
IZGUBA POTOMSTVA					
Predporodna/po ugnezditvi (ugnezditve minus živorojeni)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice s ≥ 3					
Poporodna (živorojeni minus živi 13. dan po porodu)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice s ≥ 3					

([1]) zadnji dan obdobja parjenja

▼M8

B.64 KOMBINIRANA ŠTUDIJA TOKSIČNOSTI PRI PONOVLJENIH ODMERKIH S PRESEJALNIM PRESKUSOM TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 422 (2016). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno pregledujejo ob upoštevanju znanstvenega napredka. Prvotna smernica za presejalni preskus 422 je bila sprejeta leta 1996 na podlagi protokola za „kombinirani presejalni preskus pri ponovljenih odmerkih za razmnoževanje/razvoj“, o katerem se je razpravljalo na dveh strokovnih srečanjih, in sicer leta 1990 v Londonu (1) in leta 1992 v Tokiu (2).

2. Ta preskusna metoda združuje del, ki vključuje presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje/razvoj in ki temelji na izkušnjah, pridobljenih v državah članicah z uporabo prvotne metode na obstoječih kemikalijah, ki se proizvajajo v velikih količinah, in pri raziskovalnih preskusih s snovmi za pozitivno kontrolo (3) (4), ter del, ki vključuje preskus toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki, v skladu s Smernico OECD za preskušanje 407 (28-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih, ki ustreza poglavju B.7 te priloge).

3. Ta preskusna metoda je bila posodobljena z ustreznimi končnimi točkami za endokrine motilce kot nadaljnji ukrep v okviru prednostne dejavnosti, ki jo je OECD začela izvajati leta 1998, da bi pregledala obstoječe smernice za preskušanje ter pripravila nove smernice za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih endokrinih motilcev (5). V tem okviru je bila Smernica za preskušanje 407 (ki ustreza poglavju B.7 te priloge) leta 2008 izboljšana s parametri, primernimi za zaznavanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Namen posodobitve Smernice za preskušanje 422 je bil vključitev nekaterih ustreznih končnih točk za endokrine motilce v smernice za presejalno preskušanje, pri katerih obdobja izpostavljenosti zajemajo nekatera občutljiva obdobja med razvojem (pred rojstvom in malo po rojstvu).

4. Izbrane dodatne končne točke, pomembne za endokrine motilce, ki so tudi del Smernice za preskušanje št. 443 (razširjene študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji, ki ustreza poglavju B.56 te priloge), so bile v Smernico za preskušanje št. 422 vključene na podlagi študije izvedljivosti, s katero so se obravnavala znanstvena in tehnična vprašanja njihove vključitve ter morebitne prilagoditve načrta preskusa, potrebne za njihovo vključitev (6).

5. Ta preskusna metoda naj bi zagotovila omejene informacije v zvezi z učinki preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev. Ni alternativa obstoječim preskusnim metodam B.31, B.34, B.35 ali B.56 niti jih ne nadomešča.

ZAČETNI PREUDARKI

6. Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih lastnosti preskusne kemikalije se lahko metoda s ponavljanjem odmerkov uporabi za določitev oralne toksičnosti, potem ko se s preskusi akutne toksičnosti že pridobijo začetne informacije o toksičnosti. Ta študija zagotavlja informacije o morebitnih nevarnostih za zdravje, ki jih lahko povzroči večkratna izpostavljenost v razmeroma omejenem obdobju. Metoda obsega osnovno študijo toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki, ki se lahko uporabi za kemikalije, za katere ni upravičena 90-dnevna študija (npr. če obseg proizvodnje ne presega določenih mej), ali pa se izvede kot predhodna študija za dolgoročno študijo. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in premisleke iz Smernice OECD 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (7).

▼M8

7. Poleg tega vključuje presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, zato se lahko uporabi za zagotovitev začetnih informacij o morebitnih učinkih na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev, bodisi v zgodnji fazi ocenjevanja toksikoloških lastnosti preskusnih kemikalij bodisi v zvezi s kemikalijami, ki vzbujajo zaskrbljenost. Ta preskusna metoda ne zagotavlja popolnih informacij o vseh vidikih razmnoževanja in razvoja. Zlasti zagotavlja samo omejene načine, kako po rojstvu zaznati pojavne oblike izpostavljenosti pred rojstvom ali učinke, ki jih lahko povzroči izpostavljenost po rojstvu. Zaradi (med drugim) selektivnosti končnih točk in kratkotrajnosti študije ta metoda ne zagotavlja dokazov za dokončne trditve o neobstoju učinkov na razmnoževanje/razvoj. Če ni podatkov iz drugih preskusov toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, so poleg tega pozitivni rezultati koristni za začetno oceno nevarnosti in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časovnim okvirom dodatnega preskušanja.

8. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati znotraj temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (8). V tem temeljnem okviru je izboljšana Smernica OECD za preskušanje 422 vključena na ravni 4 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o škodljivih učinkih na ustrezne končne točke za endokrini sistem. Vendar zgolj endokrinega signala ni mogoče šteti za zadosten dokaz, da je preskusna kemikalija endokrini motilec.

9. Pri preskusni metodi je poudarek tudi na nevroloških učinkih kot specifični končni točki, poudarjena je tudi potreba po pozornem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi čim več informacij. S to metodo naj bi se opredelile kemikalije z nevrotoksičnim potencialom, zaradi česar je morda upravičena dodatna poglobljena raziskava tega vidika. Poleg tega lahko metoda v osnovi nakaže imunološke učinke.

10. Če ni podatkov iz drugih študij sistemske toksičnosti, toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, nevrotoksičnosti in/ali imunotoksičnosti, so pozitivni rezultati koristni za začetno oceno tveganj in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časom dodatnega preskušanja. Preskus je lahko še zlasti koristen v okviru osnovnega pregleda OECD v zvezi s podatki o kemikaliji (SIDS) za oceno obstoječih kemikalij, o katerih je na voljo malo ali nič toksikoloških informacij, in se lahko uporabi namesto dveh ločenih preskusov toksičnosti pri ponovljenih odmerkih (Smernica OECD za preskušanje 407, ki ustreza poglavju B.7 te priloge) oziroma toksičnosti za razmnoževanje/razvoj (Smernica OECD za preskušanje 421, ki ustreza poglavju B.63 te priloge). Uporabi se lahko tudi kot študija za določanje območja odmerka za obsežnejše razmnoževalne/razvojne študije ali kadar je kako drugače pomembna.

11. Na splošno se domneva, da obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebrejimi živalmi. Posledično je lahko pri tem kombiniranem preskusu bolj zapleteno določiti velikosti odmerkov, ki so ustrezni za oceno tako splošne sistemske toksičnosti kot specifične toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, kot pa če se posamezni preskusi izvedejo ločeno. Poleg tega je lahko razlaga rezultatov preskusa v zvezi s splošno sistemsko toksičnostjo težja, kot če se izvede ločena študija s ponovljenimi odmerki, zlasti če serumski in histopatološki parametri v študiji niso ocenjeni hkrati. Zaradi teh tehničnih težav so za izvajanje tega kombiniranega presejalnega preskusa potrebne bogate

▼M8

izkušnje s preskušanjem toksičnosti. Po drugi strani pa lahko kombinirani preskus, poleg tega da vključuje manjše število živali, zagotovi tudi boljši način za razlikovanje med neposrednimi učinki na razmnoževanje/razvoj in učinki, ki so glede na druge (sistemske) učinke drugotnega pomena.

12. Pri tem preskusu je obdobje odmerjanja daljše kot pri običajni 28-dnevni študiji s ponovljenimi odmerki. Vendar se pri njem uporabi manj živali vsakega spola na skupino, kot če se običajna 28-dnevna študija s ponovljenimi odmerki izvede poleg presejalnega preskusa toksičnosti za razmnoževanje/razvoj.

13. Pri tej preskusni metodi je predvideno oralno dajanje preskusne kemikalije. Če se uporabijo drugi načini izpostavljenosti, so morda potrebne prilagoditve.

14. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

15. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

16. Preskusna kemikalija se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke najmanj štiri tedne, do vključno dneva pred predvideno usmrtitvijo (to vključuje vsaj dva tedna pred parjenjem, obdobje parjenja in približno dva tedna po parjenju). Glede na omejeno obdobje odmerjanja pred parjenjem pri samcih plodnost morda ni posebno občutljiv kazalnik toksičnosti za moda. Zato je bistven podroben histološki pregled mod. Kombinacija dvotedenskega obdobja odmerjanja pred parjenjem in poznejših opazovanj parjenja/plodnosti s skupno vsaj štiritedenskim obdobjem odmerjanja, ki mu sledi podroben histopatološki pregled spolnih žlez samcev, se šteje za zadostno, da se lahko zazna večina učinkov na plodnost pri samcih in spermatogenezo.

17. Samicam je treba dajati odmerke med celotno študijo. To vključuje dva tedna pred parjenjem (da se zajameta vsaj dva popolna pojatvena cikla), različen čas do spočetja, trajanje brejosti in vsaj 13 dni po kotitvi, do vključno dneva pred predvideno usmrtitvijo.

18. Trajanje študije po aklimatizaciji in oceni pojatvenega cikla pred odmerjanjem je odvisno od delovanja samice in traja približno 63 dni (vsaj 14 dni pred parjenjem, (do) 14 dni parjenja, 22 dni brejosti, 13 dni laktacije).

19. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in se na njih opravi obdukcija.

▼M8

OPIS METODE

Izbira živalskih vrst

20. Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljale podgane. Če se parametri, določeni v tej smernici za preskušanje 422, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. V mednarodnem validacijskem programu za zaznavanje endokrinih motilcev na podlagi Smernice OECD za preskušanje 407 je bila podgana edina uporabljena vrsta. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Uporabiti je treba zdrave živali, ki se še niso parile in niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Opredeliti je treba vrsto, sev, spol, težo in starost preskusnih živali. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati ± 20 % povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo ali študijo celotne generacije, je priporočljivo, da se v obeh študijah uporabijo živali iz istega seva in vira.

Nastanitev in hranjenje

21. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °C). Relativna vlažnost mora biti vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora. Osvetlitev mora biti umetna s svetlobnim ciklom 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi.

22. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Breje samice morajo biti v svojih kletkah in imeti na voljo material za izdelavo gnezda. Samice v laktaciji so v svojih kletkah skupaj z mladiči.

23. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

Priprava živali

24. Zdrave mlade odrasle živali se naključno izberejo ter dodelijo tretiranim skupinam in kletkam. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in zadržijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

Priprava odmerkov

25. Priporoča se, da se preskusna kemikalija daje oralno, razen če se šteje drug način dajanja za primernejšega. Če se izbere oralni način, se preskusna kemikalija običajno daje z gavažo, lahko pa tudi s hrano ali pitno vodo.

26. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem vehiklu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/suspenzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih vehiklih. Pri nevodnih vehiklih je treba poznati njihove toksične lastnosti. Določiti je treba stabilnost in homogenost preskusne kemikalije v vehiklu.

▼M8

POSTOPEK

Število in spol živali

27. Priporočljivo je, da se v vsaki skupini začne z vsaj 10 samci in 12–13 samicami. Pri samicah se pred izpostavitvijo oceni pojatvena cikličnost; živali, ki nimajo značilnih 4–5-dnevnih ciklusov, se ne vključijo v študijo; zato se priporočajo dodatne samice za zagotovitev, da je v vsaki skupini 10 samic. Razen v primeru izrazitih toksičnih učinkov naj bi se tako dobilo vsaj 8 brejih samic na skupino, kar je običajno najnižje sprejemljivo število brejih samic na skupino. Cilj je dobiti dovolj brejih samic in mladičev, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala preskusne kemikalije za vplivanje na plodnost, brejost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F_1 od spočetja do 13. dne po skotitvi. Če so med potekom študije načrtovane usmrtitve, je treba število povečati za število živali, predvidenih za usmrtitev pred zaključkom študije. Razmisliti je treba o dodatni satelitski skupini petih živali vsakega spola v kontrolni skupini in skupini, tretirani z največjim odmerkom, na katerih bi se vsaj 14 dni po tretiranju opazovale popravljivost, obstojnost ali zapoznelost nastopa sistemskih toksičnih učinkov. Živali iz satelitske skupine se ne parijo, zato se ne uporabijo za oceno toksičnosti za razmnoževanje/razvoj.

Odmerjanje

28. Običajno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in eno kontrolno skupino. Če niso na voljo ustrezni podatki o splošni toksičnosti, se lahko opravi študija za določanje območja (na živalih istega seva in izvora), s pomočjo katere se določijo odmerki, ki bodo uporabljeni. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja vehikel, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino vehikla.

29. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o toksičnosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na voljo. Upoštevati je treba tudi, da lahko obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebrejimi živalmi. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, ki povzroči toksične učinke, ne pa tudi pogina ali očitnega trpljenja. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od odmerjanja, in ugotovi največja velikost odmerka, pri kateri ni škodljivih učinkov. Velikokrat je najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerjanji pa je pogosto primerneje dodati še četrto preskusno skupino.

30. Če se ugotovijo splošna toksičnost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na endokrine občutljive končne točke.

Mejni preskus

31. Če oralna študija pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo (na podlagi telesne teže), pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne povzroči opaznih toksičnih učinkov in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh toksičnost ni pričakovana, popolna

▼M8

študija z več velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega odmerka. Pri drugih vrstah prejemanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije pogosto določajo največjo dosegljivo izpostavljenost.

Dajanje odmerkov

32. Živalim se dajejo odmerki preskusne kemikalije sedem dni na teden. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.

33. Pri preskusnih kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali. Če se kombinirana študija izvaja kot predhodna študija za dolgoročno študijo toksičnosti ali popolno študijo toksičnosti za razmnoževanje, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

Načrt za poskus

34. Odmerjanje obema spoloma se mora začeti 2 tedna pred parjenjem, potem ko so se živali aklimatizirale vsaj pet dni in ko so bile samice pregledane, ali imajo normalen pojatveni ciklus (v dvotedenskem obdobju pred tretiranjem). Študija mora biti načrtovana tako, da se ocenjevanje pojatvenega ciklusa začne kmalu potem, ko živali dosežejo polno spolno zrelost. To se lahko pri različnih sevih podgan v različnih laboratorijih nekoliko razlikuje, npr. pri podganah seva Sprague Dawley se zgodi pri 10 tednih starosti, pri podganah seva Wistar pa pri približno 12 tednih starosti. Matere s potomci je treba usmrtiti 13. dan po porodu ali kmalu zatem. Da se omogoči postenje mater čez noč pred odvzemom krvi (če je zaželena ta možnost), mater in njihovega potomstva ni treba nujno usmrtiti isti dan. Dan rojstva (tj. ko je končana kotitev) je opredeljen kot poporodni dan 0. Samice, za katere ni dokazov o kopulaciji, se usmrtijo 24–26 dni po zadnjem dnevu obdobja parjenja. Odmerjanje se pri obeh spolih nadaljuje še v obdobju parjenja. Po obdobju parjenja je treba samcem dajati odmerke še vsaj toliko časa, dokler ni doseženo najkrajše skupno obdobje odmerjanja 28 dni. Nato se usmrtijo ali pa se ohranijo pri življenju in se jim še naprej dajejo odmerki za morebitno drugo parjenje, če se šteje za ustrezno.

35. Dnevno dajanje odmerkov starševskim samicam se mora nadaljevati skozi celotno brejost in vsaj do vključno 13. dne po porodu ali dneva pred usmrtitvijo. Pri študijah, pri katerih se preskusna kemikalija prejema z vdihavanjem ali po dermalni poti, se mora odmerjanje nadaljevati vsaj do vključno 19. dne brejosti, pri čemer je treba odmerjanje znova začeti takoj, ko je to mogoče, in najpozneje 4. dan po porodu.

▼M8

36. Če so vključene živali iz satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, se ne parijo. Ohraniti jih je treba še vsaj 14 dni po prvi predvideni usmrtitvi mater, in sicer brez kakršnega koli tretiranja, da se zazna zapoznel nastop, obstojnost ali izginotje toksičnih učinkov.

37. Diagram načrta poskusa je prikazan v Dodatku 2.

Pojatveni ciklusi

38. Pojatvene cikluse je treba spremljati pred začetkom tretiranja, da se za študijo izberejo samice z rednimi ciklusi (glej odstavek 27). Dnevno je treba spremljati tudi vaginalne brise, in sicer od začetka obdobja tretiranja do dokazov o parjenju. Če obstajajo pomisleki glede učinkov akutnega stresa, zaradi katerega bi se lahko z začetkom odmerjanja spremenili pojatveni ciklusi, lahko laboratoriji preskusne živali izpostavijo za 2 tedna in nato odvzamejo vaginalne brise, da spremljajo pojatveni ciklus vsaj dva tedna v obdobju pred parjenjem, dokler ni dokazov o parjenju. Med jemanjem celic nožnice/maternične vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do psevdogravidnosti (8) (9).

Postopek parjenja

39. Običajno je treba pri tej študiji uporabiti parjenje 1: 1 (en samec na eno samico). Izjeme so možne v primeru občasnih poginov samcev. Samica mora biti nastanjena z istim samcem, dokler ni dokazov o kopulaciji ali dokler ne pretečeta dva tedna. Vsako jutro je treba samice pregledati za prisotnost semenčic ali vaginalnega zamaška. Dan brejosti 0 je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (opažen je vaginalni čep ali semenčice). Če parjenje ni bilo uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine.

Velikost legla

40. Četrti dan po skotitvi se lahko velikost posameznega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, tako da so po možnosti v vsakem leglu štirje ali pet mladičev vsakega spola, odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan. Dvema od odvečnih mladičev je treba odvzeti vzorce krvi, jih združiti in uporabiti za določitev ravni T4 v serumu. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže ali zadnjično-genitalne razdalje, ni ustrezno. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi bili v vsakem leglu štirje ali pet mladičev na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer šest samcev in štiri samice). Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev (8 ali 10 mladičev/leglo). Če je nad ciljno vrednostjo za izločitev na voljo samo en mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

41. Če velikost legla ni prilagojena, se 4. dan po porodu usmrtita dva mladiča na leglo, ki se jima odvzamejo vzorci krvi za meritve serumskih koncentracij hormona ščitnice. Če je mogoče, naj bosta dva mladiča na leglo samici, da se mladi samci prihranijo za ocene razvitosti prsnih bradavic, razen če izločitev teh mladičev pomeni, da ni več na voljo samic za oceno ob usmrtitvi. Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev 8 ali 10 mladičev na leglo (odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan). Če je glede na običajno velikost legla na voljo en sam mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

▼M8

Opažanja

42. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po odmerjanju. Evidentirati je treba podatke o zdravstvenem stanju živali. Živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti.

43. Enkrat pred prvo izpostavljenostjo (da se omogočijo primerjave na istem osebku) in nato vsaj enkrat na teden je treba opraviti natančna klinična opazovanja vseh starševskih živali. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj kletk, v katerih živali bivajo, na standardnem mestu in po možnosti vsak dan ob istem času. Opažanja je treba skrbno dokumentirati, po možnosti s pomočjo točkovanj, ki jih izrecno določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da se preskusni pogoji čim manj spreminjajo in da opazovanja po možnosti opravijo opazovalci, ki s tretiranjem niso seznanjeni. Pozornost je med drugim treba nameniti vsem spremembam na koži, kožuhu, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenju, piloerekciji, velikosti zenic in nenavadnemu vzorcu dihanja). Prav tako je treba evidentirati spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipij (npr. prekomernega čiščenja, ponavljajočega se vrtenja v krogu), težke ali podaljšane kotitve ali nenormalnega vedenja (npr. samopohabe, vzvratne hoje) (10).

44. Enkrat med študijo je treba pri petih samcih in petih samicah, naključno izbranih iz vsake skupine, oceniti senzorično reaktivnost na različne vrste dražljajev (npr. slušni, vizualni in proprioceptivni dražljaji) (8) (9) (11), moč prijema (12) in motorično aktivnost (13). Nadaljnje podrobnosti glede mogočih postopkov so na voljo v navedenih virih. Uporabiti je mogoče tudi druge postopke, ki v njih niso opisani. Pri samcih je treba ta funkcionalna opazovanja izvesti proti koncu njihovega obdobja odmerjanja, malo pred predvideno usmrtitvijo, vendar pred vzorčenjem krvi za hematološke ali kliničnokemijske preiskave (glej odstavke 53–56, vključno z opombo 1). Samice morajo biti med temi funkcionalnimi preskusi v fiziološko podobnem stanju, po možnosti pa je treba preskuse izvesti enkrat v zadnjem tednu laktacije (npr. LD 6-13), malo pred predvideno usmrtitvijo. Čas ločitve mater od mladičev naj bo čim krajši.

45. Funkcionalna opazovanja, izvedena proti koncu študije, se lahko izpustijo, če je študija izvedena kot predhodna študija za poznejšo (90-dnevno) študijo subkronične toksičnosti ali dolgoročno študijo. V takem primeru je treba funkcionalna opazovanja vključiti v to dopolnilno študijo. Po drugi strani pa lahko podatki o funkcionalnih opazovanjih, pridobljeni v tej študiji s ponavljajočimi se odmerki, pomagajo pri določanju velikosti odmerkov za poznejšo študijo subkronične toksičnosti ali dolgoročno študijo.

46. Izjemoma se lahko funkcionalna opazovanja izpustijo tudi za skupine, ki sicer kažejo znake zastrupitve v tolikšnem obsegu, da bi to močno oviralo izvedbo funkcionalnega preskusa.

47. Evidentirati je treba trajanje brejosti, ki se računa od dneva brejosti 0. Vsako leglo je treba pregledati čim prej po skotitvi, da se ugotovijo število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih in spačkov (mladičev, ki so znatno manjši od ustreznih kontrolnih mladičev) ter večje nepravilnosti.

▼M8

48. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, legla pa je treba stehtati v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj na 4. in 13. dan po porodu. Poleg opažanj glede staršev (glej odstavka 43 in 44) je treba evidentirati vsako nenavadno vedenje potomcev.

49. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti na isti poporodni dan, in sicer med poporodnim dnem 0 in 4. dnem po porodu. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (14). Število prsnih bradavic/areol pri mladih samcih je treba prešteti 12. ali 13. dan po porodu, kot je priporočeno v Smernici OECD 151 (15).

Telesna teža in poraba hrane/vode

50. Samce in samice je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, nato pa vsaj enkrat tedensko in ob usmrtitvi. Med brejostjo je treba samice stehtati na dneve 0, 7, 14 in 20 ter v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) in vsaj 4. in 13. dan po porodu. O teh opažanjih je treba posebej poročati za vsako odraslo žival.

51. Porabo hrane je treba v obdobju pred parjenjem, med brejostjo in laktacijo meriti vsaj enkrat na teden. Med parjenjem merjenje porabe hrane ni obvezno. V teh obdobjih je treba meriti tudi porabo vode, če se preskusna kemikalija daje s tem medijem.

Hematologija

52. Enkrat med študijo je treba pri petih samcih in petih samicah, naključno izbranih iz vsake skupine, opraviti naslednje hematološke preiskave: hematokrit, koncentracija hemoglobina, število eritrocitov, retikulociti, skupno in diferencialno število levkocitov, število trombocitov ter čas/zmožnost koagulacije. Druge preiskave, ki jih je treba opraviti, če imajo preskusna kemikalija ali njeni domnevni metaboliti oksidativne lastnosti oziroma če obstaja sum, da jih imajo, vključujejo koncentracijo methemoglobina in Heinzeva telesca.

53. Vzorce krvi je treba vzeti na imenovanem mestu. Samice morajo biti med vzorčenjem v fiziološko podobnem stanju. Da se preprečijo praktične težave, povezane z različnim nastopom brejosti, se lahko vzorci krvi samicam odvzamejo ob koncu obdobja pred parjenjem, namesto da se vzorčijo neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim. Vzorce krvi samcev je treba po možnosti odvzeti neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim. Druga možnost je, da se samcem kri odvzame tudi ob koncu obdobja pred parjenjem, če je bila za samice izbrana ta časovna točka.

54. Vzorce krvi je treba shraniti v ustreznih pogojih.

Klinična biokemija

55. Klinične biokemične določitve za ugotavljanje glavnih toksičnih učinkov v tkivih in zlasti učinkov na ledvice in jetra je treba opraviti na vzorcih krvi, pridobljenih od izbranih petih samcev in petih samic iz vsake skupine.

▼**M8**

Priporočeno je, da živali pred jemanjem vzorcev krvi čez noč postimo. ([1]) Preiskave plazme ali seruma morajo vključevati določanje natrija, kalija, glukoze, skupnega holesterola, sečnine, kreatinina, skupnih proteinov in albumina, najmanj dveh encimov, ki sta kazalnika hepatoceličnih učinkov (kot so alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza in sorbitol-dehidrogenaza), in žolčnih kislin. Meritve dodatnih encimov (jetrnega ali drugega izvora) in bilirubina lahko v nekaterih okoliščinah zagotovijo koristne informacije.

56. Vzorci krvi z določenega mesta se vzamejo po naslednjem razporedu:

— vsaj dvema mladičema na leglo 4. dan po porodu, če število mladičev to omogoča (glej odstavka 40 in 41);

— vsem materam in vsaj dvema mladičema na leglo ob usmrtitvi 13. dan ter

— vsem odraslim samcem ob usmrtitvi.

Vsi vzorci krvi se shranijo v ustreznih pogojih. V vzorcih krvi mladičev, starih 13 dni, in odraslih samcev se ocenijo serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4). Dodatna ocena T4 v vzorcih krvi mater in mladičev, starih 4 dni, se izvede po potrebi. Po potrebi se lahko izmerijo tudi drugi hormoni. Za analize hormonov ščitnice se lahko kri mladičev združi po leglih. Hormona ščitnice (T4 in TSH) je treba po možnosti meriti „skupaj“.

57. Po želji se lahko v zadnjem tednu študije pri petih naključno izbranih samcih iz vsake skupine opravijo naslednje analize urina, dobljenega z zbiranjem v določenih časovnih obdobjih: videz, količina, osmolalnost ali specifična teža, pH, proteini, glukoza in kri/krvne celice.

58. Poleg tega je treba razmisliti o študijah za preiskovanje serumskih označevalcev splošnih poškodb tkiva. Druge določitve, ki morajo biti izvedene, če obstaja možnost ali sum, da bodo znane lastnosti preskusne kemikalije vplivale na povezane metabolične profile, vključujejo kalcij, fosfat, trigliceride na tešče in glukozo na tešče, posebne hormone, methemoglobin in holinesterazo. Te je treba opredeliti za vsak primer posebej.

59. Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:

— čas usmrtitve zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva;

([1]) Za številne preiskave seruma in plazme, zlasti za določanje glukoze, se priporoča postenje čez noč. Glavni razlog za to je, da bi povečana spremenljivost, ki bi se zagotovo pojavila, če se žival ne bi postila, lahko prikrila manj opazne učinke in otežila razlago. Po drugi strani pa postenje čez noč lahko vpliva na splošno presnovo (brejih) živali, zmoti laktacijo in vedenje med dojenjem, zlasti v študijah, pri katerih se kemikalija daje s hrano, pa lahko zmoti dnevno izpostavljenost preskusni kemikaliji. Če se uporabi postenje čez noč, je treba klinične biokemične preiskave izvesti po zaključku funkcionalnih opazovanj v četrtem tednu študije pri samcih. Samice je treba ohraniti pri življenju še dodaten dan po odstranitvi mladičev, na primer na 13. dan po porodu. Matere je treba postiti čez noč na 13.–14. dan laktacije, kri, odvzeta ob usmrtitvi, pa se uporabi za kliničnokemijske parametre.

▼M8

— način usmrtitve, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov;

— preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.

60. Vzorce plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne.

61. Če pretekli izhodiščni podatki niso ustrezni, je treba razmisliti o določitvi hematoloških in kliničnih biokemičnih spremenljivk pred začetkom dajanja odmerkov ali po možnosti pri sklopu živali, ki niso vključene v preskusne skupine. Za samice je treba podatke pridobiti od doječih živali.

PATOLOGIJA

Makroskopska obdukcija

62. Na vseh odraslih živalih iz študije je treba opraviti popolno in natančno makroskopsko obdukcijo, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtin, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Evidentirati je treba število ugnezditev. Vaginalne brise je treba pregledati na dan obdukcije, da se ugotovi faza pojatvenega ciklusa in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami reproduktivnih organov samic.

63. Z mod, nadmodkov ter prostate in semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami kot celote je treba pri vseh odraslih samcih, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato čim prej po disekciji izmeriti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Poleg tega lahko teža neobveznih organov vključuje sistem mišice *levator ani* z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi in glavico penisa pri samcih ter oba jajčnika (mokra teža) in maternico (vključno z materničnim vratom) pri samicah; če se navedeno vključi, je treba te teže zbrati čim prej po disekciji. Pri vseh odraslih živalih je treba shraniti jajčnike, moda, nadmodke, pomožne spolne organe in vse organe, na katerih se kažejo makroskopske lezije.

64. Ščitnične žleze vseh odraslih samcev in samic ter enega mladega samca in samice, starih 13 dni, iz vsakega legla je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za predvidene nadaljnje histopatološke preiskave. Teža ščitnice se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim in jih hraniti v ustreznih pogojih (glej odstavek 56).

▼M8

65. Poleg tega je treba vsaj petim odraslim samcem in samicam, naključno izbranim iz vsake skupine (to ne velja za živali, ki so najdene poginjajoče in/ali so evtanazirane pred koncem študije), z jeter, ledvic, nadledvičnih žlez, priželjca, vranice, možganov in srca, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva, nato pa čim prej po disekciji določiti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo: vse vidne lezije, možgane (reprezentativne regije, vključno z velikimi in malimi možgani ter mostom), hrbtenjačo, oko, želodec, tanko in debelo črevo (vključno s Peyerjevimi ploščami), jetra, ledvice, nadledvične žleze, vranico, srce, priželjc, sapnik in pljuča (shranijo se tako, da se napihnejo s fiksativom in nato potopijo), spolne žleze (moda in jajčnike), pomožne spolne organe (maternico in vrat, nadmodek, prostato in semenske mešičke s koagulacijskimi žlezami), vagino, sečni mehur, bezgavke (poleg najbližje drenažne bezgavke je treba vzeti še eno bezgavko v skladu z izkušnjami laboratorija (16)), periferni živec (ishiadični ali tibialni), po možnosti v neposredni bližini mišice, skeletno mišico in kost s kostnim mozgom (rezina ali sveže prepariran punktat kostnega mozga). Priporočljivo je, da se moda fiksirajo s potopitvijo v Bouinov ali prilagojen Davidsonov fiksativ (16) (17) (18); fiksacija v formalinu za ta tkiva ni priporočljiva. Tunico albugineo je dovoljeno nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije.

66. Z naslednjimi tkivi je mogoče pridobiti koristne informacije o endokrinih učinkih: spolnimi žlezami (jajčniki in modi), pomožnimi spolnimi organi (maternico, vključno z materničnim vratom, nadmodkom, semenskimi mešički s koagulacijskimi žlezami ter dorzolateralno in ventralno prostato), vagino, hipofizo, mlečno žlezo samcev in nadledvično žlezo. Spremembe v mlečnih žlezah samcev niso bile zadostno dokumentirane, vendar je lahko ta parameter zelo občutljiv za snovi z estrogenim delovanjem. Opazovanje organov/tkiv, ki niso navedeni v odstavku 65, je neobvezno.

67. Pri poginulih mladičih in mladičih, usmrčenih 13. dan po porodu ali kmalu zatem, je treba skrbno pregledati vsaj zunanjost, da se odkrijejo večje nepravilnosti. Posebno pozornost je treba posvetiti zunanjim reproduktivnim genitalijam, pri katerih je treba pregledati, ali so se pojavili znaki spremenjenega razvoja.

Histopatologija

68. V celoti je treba opraviti histopatološke preiskave shranjenih organov in tkiv izbranih živali iz kontrolne skupine in skupine z velikim odmerkom (s posebnim poudarkom na fazah spermatogeneze v spolnih žlezah samcev in histopatologiji intersticijske celične strukture mod). Ščitnične žleze mladičev in preostalih odraslih živali se lahko pregledajo po potrebi. Te preiskave je treba razširiti na živali iz skupin, tretiranih z drugimi odmerjanji, če se v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opazijo spremembe, povezane s tretiranjem. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih za histopatologijo (10).

69. Pregledati je treba vse vidne lezije. Da se lažje pojasnijo vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov, je treba pregledati ciljne organe v skupinah z drugimi odmerki, zlasti v skupinah, v katerih naj ne bi bili opaženi škodljivi učinki.

▼M8

70. Če se uporablja satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so bili opaženi učinki v tretiranih skupinah.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

71. Podatke je treba navesti za vsako žival posebej. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, poginulih med preskusom ali evtanaziranih iz humanih razlogov, čas pogina ali evtanazije, število plodnih živali, število brejih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanjem in resnostjo morebitnih toksičnih učinkov, vrsto histopatoloških sprememb in vse ustrezne podatke o leglu. Format zbirnega poročila v obliki preglednice, ki se je izkazal kot zelo koristen za oceno učinkov na razmnoževanje/razvoj, je naveden v Dodatku 3.

72. Če je mogoče, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Pri primerjavah učinka vzdolž odmernega območja se je treba izogibati večkratnim preskusom t. Statistične metode je treba izbrati med zasnovo študije. Statistična analiza zadnjično-genitalne razdalje in razvitosti prsnih bradavic mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upoštevajo učinki legla. Kadar je ustrezno, je enota analize leglo. Statistična analiza telesne teže mladičev mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upošteva velikost legla. Zaradi omejenega obsega študije imajo statistične analize v obliki preskusov „pomembnosti“ omejeno vrednost za številne končne točke, zlasti končne točke razmnoževanja. Nekatere najpogosteje uporabljene metode, zlasti parametrični testi za meritve centralne tendence, niso ustrezne. Če se uporabijo statistične analize, mora biti izbrana metoda ustrezna za porazdelitev preučevane spremenljivke, izbrati pa jo je treba pred začetkom študije.

Vrednotenje rezultatov

73. Ugotovitve te toksikološke študije je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, obdukcijo in mikroskopske ugotovitve. Vrednotenje vključuje razmerje med odmerkom preskusne kemikalije in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z makroskopskimi lezijami, ugotovljenimi ciljnimi organi, neplodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivostjo reproduktivnosti in legla, spremembami telesne mase, učinki na smrtnost in drugimi toksičnimi učinki.

74. Zaradi kratkotrajnega tretiranja samca je treba pri vrednotenju učinkov na razmnoževanje pri samcih histopatologijo mod in nadmodkov obravnavati skupaj s podatki o plodnosti. Kot pomoč pri razlagi študije je lahko koristna tudi uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov glede razmnoževanja/razvoja (npr. za velikost legla, zadnjično-genitalno razdaljo, razvitost prsnih bradavic, ravni T4 v serumu), če so na voljo.

75. Za kontrolo kakovosti se predlagata zbiranje podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z zaznavanjem endokrinih motilcev. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se vrednotijo dejanske študije.

▼M8

Poročilo o preskusu

76. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Vehikel (po potrebi):

— utemeljitev izbire vehikla, če to ni voda.

Preskusne živali:

— uporabljena vrsta/sev;

— število, starost in spol živali;

— izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

— teža posamezne živali na začetku preskusa.

— utemeljitev vrste, če to ni podgana.

Preskusni pogoji:

— utemeljitev izbire velikosti odmerkov;

— podrobni podatki o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka;

▼M8

— podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;

— preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno;

— podrobnosti o kakovosti hrane in vode;

— podroben opis postopka naključnega izbiranja mladičev za izločitev, če se izločijo.

Rezultati:

— telesna teža/spremembe telesne teže;

— poraba hrane, in če je ustrezno, poraba vode;

— podatki o toksičnem odzivu po spolu in odmerku, vključno s plodnostjo, brejostjo in drugimi znaki

— toksičnosti;

— trajanje brejosti; toksični ali drugi učinki na razmnoževanje, potomce, poporodno rast itd.;

— vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o popravljivosti);

— ocene senzorične aktivnosti, moči oprijema in motorične aktivnosti;

— hematološki preskusi z ustreznimi referenčnimi vrednostmi;

— klinični biokemijski preskusi z ustreznimi referenčnimi vrednostmi;

— število odraslih samic z normalnim ali nenormalnim pojatvenim ciklusom in trajanje ciklusa;

— število živorojenih in izgub po ugnezditvi;

— število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami; splošna ocena zunanjih genitalij, število spačkov;

— čas pogina med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka študije;

— število ugnezditev, velikost legla in teže legla ob evidentiranju;

— podatki o telesni teži mladičev;

— zadnjično-genitalna razdalja vseh mladičev (in telesna teža na dan meritve zadnjično-genitalne razdalje);

— razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih;

— ravni ščitničnega hormona, mladiči, stari 13 dni, in odrasli samci (ter matere in mladiči, stari 4 dni, če se merijo);

— telesna teža ob usmrtitvi in podatki o teži organov za starševske živali;

— izsledki obdukcije;

— podroben opis ugotovitev histopatoloških preiskav;

— podatki o absorpciji (če so na voljo);

— statistična obdelava rezultatov, če je to primerno.

Obravnava rezultatov.

Sklepne ugotovitve.

▼M8

Razlaga rezultatov

77. S študijo bo zagotovljeno vrednotenje toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, povezane z dajanjem ponovljenih odmerkov. Zlasti ker je poudarek tako na splošni toksičnosti kot na toksičnosti za razmnoževanje/razvoj končnih točk, rezultati študije omogočajo razlikovanje med učinki na razmnoževanje/razvoj, ki se pojavijo v odsotnosti splošne toksičnosti, in učinki, ki so izraženi samo na stopnjah, ki so toksične tudi za starše (glej odstavke 7–11). Pokazala bi lahko potrebo po dodatnih preiskavah in zagotovila smernice za zasnovo poznejših študij. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in razvoju glej Smernico OECD 43 (19). Smernica OECD 106 o histološkem vrednotenju preskusov endokrinega in razmnoževalnega sistema pri glodavcih (16) zagotavlja informacije o pripravi in ocenjevanju (endokrinih) organov in vaginalnih brisov, ki so lahko koristne za to preskusno metodo.

VIRI

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27.–29. oktober 1992. Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(3) Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M. Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M., in Hayashi, Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141–149.

(4) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y., in Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89–95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. marec 1998, na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 217), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19.), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼**M8**

(8) Goldman, J. M., Murr, A. S., Buckalew, A. R., Ferrell, J. M., in Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, del B, 80 (2), 84–97.

(9) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons, v: Auston, C. R., in Short, R. V. (ur.). Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria. Environmental Health Criteria Document (št. 60).

(11) Moser, V. C., McDaniel, K. M., in Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl.*Pharmacol*., 108, 267–283.

(12) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., in Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233–236.

(13) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599–609.

(14) Gallavan, R. H., Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., in Reynolds, V. L. (1999). 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', Reproductive Toxicology, 13: 383–390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 151). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 106), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(17) Hess, R. A., in Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin, R. E., in Heindel, J. J. (ur.). Academic Press: San Diego, Kalifornija, str. 52–85.

(18) Latendresse, J. R., Warbrittion, A. R, Jonassen, H., in Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol*. *Pathol*. 30, 524–533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 43), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(20) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV (GLEJ TUDI (20) SMERNICO OECD 150)

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17 β-estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. T_3) v sesalskem organizmu.

Kemikalija je snov ali zmes.

Toksičnost za razvoj pojavna oblika toksičnosti za razmnoževanje, ki se pri potomcih kaže kot pred-, ob- in poporodna strukturna ali funkcionalna motnja.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Očitna toksičnost je splošen izraz, ki opisuje jasne znake toksičnosti po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zadostovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov toksičnosti in verjetno smrt.

Poškodbe plodnosti pomenijo motnje razmnoževalnih funkcij ali zmogljivosti pri samcih ali samicah.

Toksičnost pri materi škodljivi učinki na breje samice, ki se pojavijo bodisi specifično (neposredni učinek) bodisi nespecifično (posredni učinek) in so povezani z brejostjo.

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (no-observed-adverse-effect level). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogeni hormon (npr. 17 β-estradiola) v sesalskem organizmu.

Toksičnost za razmnoževanje pomeni škodljive učinke na potomstvo in/ali poškodbe razmnoževalnih funkcij ali zmogljivosti pri samcih in samicah.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

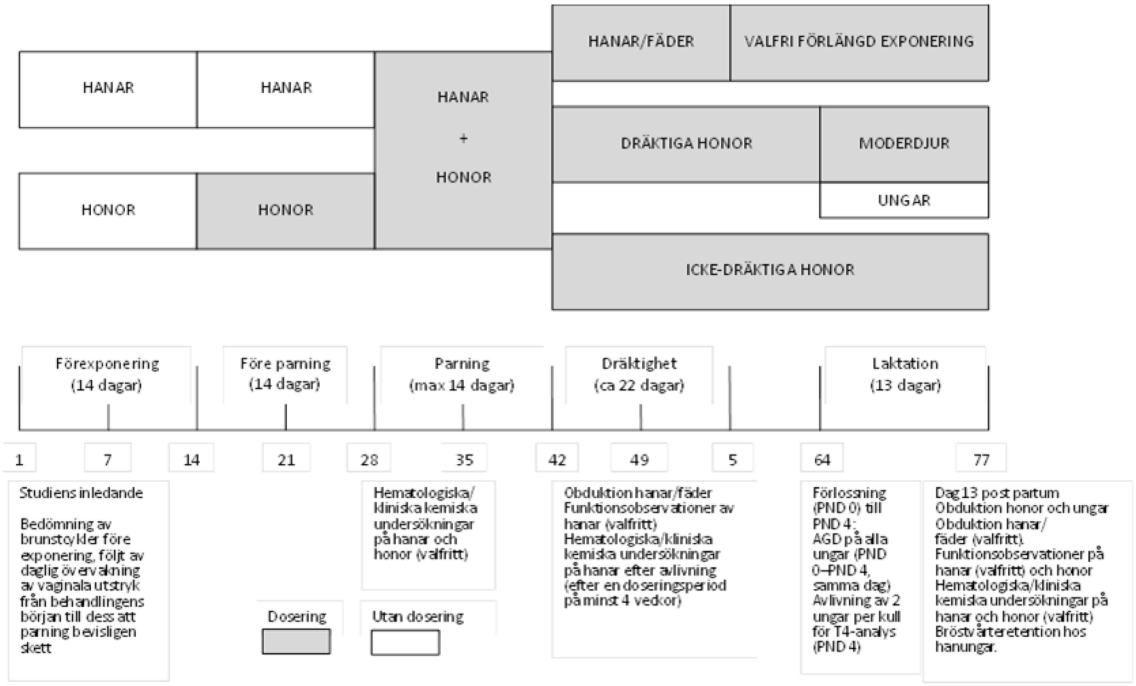
Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. T_3) v sesalskem organizmu.

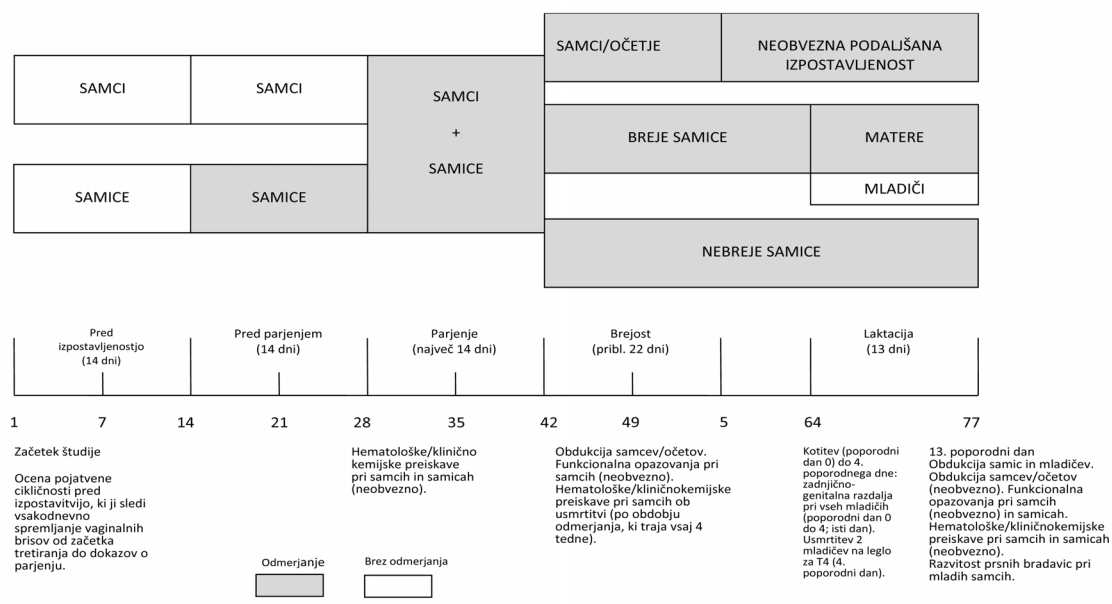
Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

▼**M8**

Dodatek 2

DIAGRAM NAČRTA POSKUSA Z NAVEDBO NAJDALJŠEGA TRAJANJA ŠTUDIJE NA PODLAGI POLNEGA 14-DNEVNEGA OBDOBJA PARJENJA





▼**M8**

Dodatek 3

ZBIRNO POROČILO O UČINKIH NA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ V OBLIKI PREGLEDNICE

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Odmerjanje (enote).....	0 (kontrola)	…	…	…	…
Začetni pari (N)					
Ciklus estrusa (vsaj srednja dolžina in pogostnost nerednih ciklusov)					
Samice, ki kažejo znake kopulacije (N)					
Samice, ki so dosegle brejost (N)					
Dnevi spočetja 1–5 (N)					
Dnevi spočetja 6–... ([1]) (N)					
Brejost ≤ 21 dni (N)					
Brejost = 22 dni (N)					
Brejost ≥ 23 dni (N)					
Matere z živimi novorojenimi mladiči (N)					
Matere z živimi mladiči 4. dan po porodu (N)					
Ugnezditve/mati (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati ob rojstvu (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati 4. dan (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) ob rojstvu (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) 4. dan (srednja vrednost)					
Teža legla ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža legla 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob meritvi zadnjično-genitalne razdalje (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah)					
Zadnjično-genitalna razdalja pri mladičih na isti dan po porodu, od rojstva do 4. dne (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah, označi dan po porodu)					
Teža mladičev 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev 13. dan (srednja vrednost)					

▼**M8**

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih 13. dan (srednja vrednost)					
MLADIČI Z ANOMALIJAMI					
Matere z 0					
Matere z 1					
Matere z ≥ 2					
IZGUBA POTOMSTVA					
Predporodna (ugnezditve minus živorojeni)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					
Poporodna (živorojeni minus živi 13. dan po porodu)					
Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					

([1]) zadnji dan obdobja parjenja

▼M8

B.65 *IN VITRO* PRESKUSNA METODA MEMBRANSKE PREGRADE V ZVEZI Z JEDKOSTJO ZA KOŽO

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435 (2015). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepopravljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]). Ta preskusna metoda, enakovredna posodobljeni Smernici OECD za preskušanje 435, določa *in vitro* preskusno metodo membranske pregrade, ki se lahko uporabi za opredelitev jedkih kemikalij. Pri tej preskusni metodi se uporablja umetna membrana, zasnovana tako, da se na jedke kemikalije odzove podobno kot živalska koža *in situ*.

2. Jedkost za kožo se tradicionalno ocenjuje tako, da se preskusna kemikalija nanese na kožo živih živali, po določenem času pa se oceni obseg poškodb tkiva (2). Poleg te preskusne metode je bilo še več drugih preskusnih metod *in vitro* sprejetih kot alternative (3) (4) standardnemu postopku *in vivo* na koži kuncev (poglavje B.4 te priloge, enakovredno Smernici OECD za preskušanje 404), ki se uporablja za opredelitev jedkih kemikalij (2). V večstopenjski strategiji preskušanja in vrednotenja GHS ZN za oceno in razvrstitev jedkosti za kožo ter smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z draženjem kože/jedkostjo za kožo se priporoča uporaba validiranih in sprejetih preskusnih metod *in vitro* v okviru modulov 3 in 4 (1) (5). S pristopi IATA se opisuje več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, ter (i) zagotavljajo smernice o tem, kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje, med drugim kadar so dobljeni negativni rezultati (5). Pri tem modularnem pristopu se lahko pozitivni rezultati iz preskusnih metod *in vitro* uporabijo za razvrstitev kemikalije kot jedke, ne da bi bilo potrebno preskušanje na živalih, s čimer se zmanjša in izpopolni uporaba živali ter preprečita bolečina in trpljenje, ki ju lahko povzroči uporaba živali za ta namen.

3. Validacijske študije so bile dokončane za model membranske pregrade *in vitro*, ki je na trgu na voljo kot Corrositex® (6) (7) (8) ter za podatkovno zbirko 163 snovi in zmesi kaže 79-odstotno splošno točnost pri napovedi jedkosti za kožo (128/163), 85-odstotno splošno točnost pri občutljivosti (76/89) in 70-odstotno splošno točnost pri specifičnosti (52/74) (7). Na podlagi njene priznane veljavnosti se je uporaba te validirane referenčne metode (VRM) priporočala v okviru večstopenjske strategije preskušanja za oceno potenciala nevarnosti kemikalij v zvezi z jedkostjo za kožo (5) (7). Preden se omogoči uporaba modela membranske pregrade *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo za regulativne namene, je treba določiti njegovo zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njegova primerljivost z VRM (9) v skladu s predhodno

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M8

določenimi standardi izvajanja (10). Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v enakovredno smernico OECD za preskušanje. Trenutno je s Smernico OECD za preskušanje 435 in to preskusno metodo zajeta samo ena metoda *in vitro*, tj. model Corrositex®, ki je na voljo na trgu.

4. Druge preskusne metode za preskušanje jedkosti za kožo temeljijo na uporabi rekonstituirane človeške kože (Smernica OECD 431) (3) in izolirane kože podgan (Smernica OECD 430) (4). Ta smernica za preskušanje omogoča tudi razvrstitev jedkih kemikalij v tri podkategorije jedkosti po GHS ZN in tri skupine transportne embalaže ZN v zvezi z nevarnostjo za jedkost. Ta smernica za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2006, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in posodobitve seznama snovi za preverjanje usposobljenosti.

OPREDELITVE POJMOV

5. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

6. Preskus, opisan v tej preskusni metodi, omogoča opredelitev jedkih preskusnih kemikalij in njihovo razvrstitev v podkategorije v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (preglednica 1). Poleg tega se lahko taka preskusna metoda uporabi za sprejemanje odločitev o jedkosti in nejedkosti določenih razredov kemikalij, npr. organskih in anorganskih kislin, kislinskih derivatov ([1]), in baz za namene preskušanja nekaterih oblik transporta (7)(11)(12). S to preskusno metodo je opisan splošen postopek, podoben validirani referenčni preskusni metodi (7). Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o dražilnosti za kožo, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 (enakovredno Smernici OECD za preskušanje 439) izrecno obravnava učinek dražilnosti za kožo *in vitro* na zdravje (13). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (5).

Preglednica 1

Kategorija in podkategorije snovi, ki so jedke za kožo, po GHS ZN ([1])

Kategorija jedkih snovi (kategorija 1) (za organe, ki ne uporabljajo podkategorij)	Podkategorije potencialnih jedkih snovi ([1]) (za organe, ki uporabljajo podkategorije, vključno z uredbo CLP)	Jedko pri ≥ tretjini živali	
		Izpostavljenost	Opažanje
Jedka snov	Podkategorija jedkih snovi 1A	≤ 3 minute	≤ 1 ura
	Podkategorija jedkih snovi 1B	> 3 minute / ≤ 1 ura	≤ 14 dni
	Podkategorija jedkih snovi 1C	> 1 ura / ≤ 4 ure	≤ 14 dni

([1]) Za EU se v uredbi CLP uporabljajo tri podkategorije jedkosti za kožo, in sicer 1A, 1B in 1C.

7. Validirana referenčna metoda (7) je omejena s tem, da številne nejedke kemikalije in nekatere jedke kemikalije na podlagi rezultatov začetnega preskusa združljivosti morda niso primerne za preskušanje (glej odstavek 13). V vodi raztopljene kemikalije s pH v razponu od 4,5 do 8,5 pogosto niso primerne za preskušanje; vendar 85 % kemikalij, preskušenih v tem

([1]) „Kislinski derivat“ je nespecifično poimenovanje razreda in je na splošno opredeljen kot kemikalija, proizvedena iz kisline bodisi neposredno bodisi z modifikacijo ali delno substitucijo. Ta razred vključuje anhidride, halogenirane kisline, soli in druge vrste kemikalij.

▼M8

razponu pH, pri preskušanju na živalih ni bilo jedkih (7). Metoda membranske pregrade *in vitro* se lahko uporabi za preskušanje trdnih snovi (topnih ali netopnih v vodi), tekočih snovi (vodnih raztopin ali ne) in emulzij. Vendar preskusnih kemikalij, ki ne povzročijo zaznavne spremembe pri preskusu združljivosti (tj. spremembe barve v sistemu za zaznavanje kemikalij validirane referenčne preskusne metode), ni mogoče preskusiti z metodo membranske pregrade in jih je treba preskusiti z uporabo drugih preskusnih metod.

NAČELO PRESKUSA

8. Preskusni sistem je sestavljen iz dveh delov: sintetične makromolekularne biološke pregrade in sistema za zaznavanje kemikalij; pri tej preskusni metodi se s sistemom za zaznavanje kemikalij odkrije poškodba membranske pregrade, ki je nastala zaradi jedke preskusne kemikalije po nanosu preskusne kemikalije na površino sintetične makromolekularne membranske pregrade (7) z domnevno enakimi mehanizmi jedkosti, kot delujejo na živi koži.

9. Prehajanje skozi membransko pregrado (ali preboj) se lahko meri z različnimi postopki ali sistemi za zaznavanje kemikalij, vključno s spremembo barve barvila, ki je indikator pH, ali neke druge lastnosti raztopine indikatorja pod pregrado.

10. Membransko pregrado je treba določiti kot veljavno, tj. ustrezno in zanesljivo za predvideno uporabo. To vključuje zagotovitev, da so različni pripravki skladni glede lastnosti pregrade, npr. sposobni zadržati nejedke snovi, da se lahko jedke lastnosti kemikalij razvrstijo v različne podkategorije jedkosti po GHS ZN (1). Dodeljena razvrstitev temelji na času, ki ga kemikalija potrebuje za prehod skozi membransko pregrado do raztopine indikatorja.

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

11. Pred redno uporabo metode membranske pregrade *in vitro*, ki je v skladu s to preskusno metodo, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje usposobljenosti, priporočenih v preglednici 2. Kadar snov s seznama ni na voljo ali če je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (10)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

Preglednica 2

Snovi za preverjanje usposobljenosti ([1])

Snov ([2])	Št. CAS	Kemijski razred	Podkategorija *in vivo* po GHS ZN ([3])	Podkategorija *in vitro* po GHS ZN ([3])
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	anorganske kisline	1A	1A
Dušikova kislina	7697-37-2	anorganske kisline	1A	1A
Fosforjev pentaklorid	10026-13-8	prekurzorji anorganskih kislin	1A	1A
Valerilklorid	638-29-9	kislinski kloridi	1B	1B
Natrijev hidroksid	1310-73-2	anorganske baze	1B	1B

▼M8

Snov ([2])	Št. CAS	Kemijski razred	Podkategorija *in vivo* po GHS ZN ([3])	Podkategorija *in vitro* po GHS ZN ([3])
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	alifatski amini	1B	1B
Benzensulfonil klorid	98-09-9	kislinski kloridi	1C	1C
N,N-dimetil benzilamin	103-83-3	anilini	1C	1C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	alifatski amini	1C	1C
Evgenol	97-53-0	fenoli	NJ	NJ
Nonil akrilat	2664-55-3	akrilati/metakrilati	NJ	NJ
Natrijev bikarbonat	144-55-8	anorganske soli	NJ	NJ

([1]) 12 zgoraj navedenih snovi vsebuje tri snovi iz vsake od treh podkategorij po GHS ZN za jedke snovi in tri nejedke snovi, na voljo so pri komercialnih dobaviteljih, podkategorija po GHS ZN pa temelji na rezultatih visokokakovostnega preskušanja *in vivo*. Te snovi so s seznama 40 referenčnih snovi, ki so vključene na najkrajši možni seznam kemikalij, opredeljenih za dokazovanje točnosti in zanesljivosti preskusnih metod, ki so strukturno in funkcionalno podobne validiranim referenčnim preskusnim metodam, in so bile izbrane izmed 163 referenčnih kemikalij, ki so se prvotno uporabljale za validacijo referenčne preskusne metode (Corrositex®) (7) (10) (14). Cilj tega izbirnega postopka je bil vključiti čim več kemikalij, ki: so predstavljale razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; jedke snovi iz embalažnih skupin ZN I, II in III), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z validirano referenčno metodo; so predstavljale kemijske razrede, uporabljene v validacijskih postopkih; imajo dobro opredeljene kemijske strukture; so dale obnovljive rezultate v validirani referenčni preskusni metodi; so dale dokončne rezultate pri referenčnem preskusu *in vivo*; so bile na voljo na trgu; niso bile povezane s previsokimi stroški odstranjevanja (14).

([2]) Snovi, preskušene nerazredčene ali z ≥ 90-odstotno čistostjo.

([3]) Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za kategorije 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN. NJ: nejedka snov.

POSTOPEK

12. V naslednjih odstavkih so opisani elementi in postopki preskusne metode umetne membranske pregrade za oceno jedkosti (7) (15) na podlagi trenutne VRM, tj. metode Corrositex®, ki je na voljo na trgu. Membranska pregrada ter raztopine za preverjanje združljivosti/indikatorje in kategorizacijo se lahko izdelajo, pripravijo ali dobijo na trgu, tako kot v primeru VRM Corrositex®. Na voljo je vzorčni protokol preskusne metode za validirano referenčno preskusno metodo (7). Preskušanje je treba izvesti pri sobni temperaturi (17–25 °C), elementi pa morajo izpolnjevati naslednje pogoje.

Preskus združljivosti preskusne kemikalije

13. Pred izvedbo preskusa membranske pregrade se izvede preskus združljivosti, da se ugotovi, ali je preskusna kemikalija s sistemom za zaznavanje kemikalij zaznavna. Če sistem za zaznavanje kemikalij ne zazna preskusne kemikalije, preskusna metoda membranske pregrade ni primerna za ocenjevanje morebitne jedkosti navedene preskusne kemikalije in je treba uporabiti drugo preskusno metodo. Pri sistemu za zaznavanje kemikalij in pogojih izpostavljenosti, ki se uporabljajo za preskus združljivosti, je treba upoštevati izpostavljenost pri poznejšem preskusu membranske pregrade.

Preskus kategorizacije preskusne kemikalije glede na časovno merilo

14. Če je to ustrezno za preskusno metodo, je treba na preskusni kemikaliji, ki je glede na preskus združljivosti primerna, opraviti preskus kategorizacije glede na časovno merilo, tj. presejalni preskus za razlikovanje med šibkimi ali močnimi kislinami ali bazami. Pri validirani referenčni preskusni metodi se

▼M8

na primer preskus kategorizacije glede na časovno merilo uporablja za ugotovitev, katerega od dveh časovnih meril bi bilo treba uporabiti glede na to, ali se zazna velika kisla ali alkalna rezerva. Za določitev jedkosti in podkategorije jedkosti za kožo po GHS ZN je treba uporabiti dva različna prebojna časa, odvisno od kisle ali alkalne rezerve preskusne kemikalije.

ELEMENTI PRESKUSNE METODE MEMBRANSKE PREGRADE

Membranska pregrada

15. Membranska pregrada je sestavljena iz dveh delov: proteinskega makromolekularnega vodnega gela in prepustne podporne membrane. Proteinski gel mora biti neprepusten za tekoče in trdne snovi, vendar ga je mogoče korodirati in narediti prepustnega. Popolnoma zgrajeno membransko pregrado je treba hraniti pri vnaprej določenih pogojih, ki dokazano preprečujejo slabšanje gela, tj. sušenje, rast mikrobov, dvigovanje in pokanje, zaradi katerega bi se poslabšala njegova učinkovitost. Določiti je treba sprejemljivo obdobje shranjevanja, po poteku katerega se pripravki membranske pregrade ne smejo uporabljati.

16. Prepustna podporna membrana zagotavlja mehansko podporo proteinskemu gelu med postopkom želiranja in izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Preprečevati mora pogrezanje in dvigovanje gela ter biti takoj prepustna za vse preskusne kemikalije.

17. Proteinski gel, ki ga sestavlja protein, npr. keratin, kolagen, ali zmes proteinov, ki tvorijo gelasti matriks, se uporablja kot ciljna snov za preskusno kemikalijo. Proteinski material se nanese na površino podporne membrane in pusti želirati, preden se membranska pregrada namesti nad raztopino indikatorja. Proteinski gel mora biti enakomerno debel in gost, brez zračnih mehurčkov ali nepravilnosti, ki bi lahko vplivale na njegovo funkcionalno celovitost.

Sistem za zaznavanje kemikalij

18. Raztopina indikatorja, ki je enaka raztopini, uporabljeni za preskus združljivosti, mora reagirati na prisotnost preskusne kemikalije. Uporabiti je treba barvilo, ki je indikator pH, ali kombinacijo barvil, npr. krezol rdeče in metil oranžno, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagirajo s spremembo barve. Merilni sistem je lahko vizualni ali elektronski.

19. Pri sistemih za zaznavanje, razvitih za zaznavanje prehoda preskusne kemikalije skozi membransko pregrado, je treba oceniti njihovo ustreznost in zanesljivost, da se dokažejo razpon zaznavnih kemikalij in količinske omejitve zaznavanja.

IZVEDBA PRESKUSA

Namestitev elementov preskusne metode

20. Membranska pregrada se namesti v vialo (ali epruveto), v kateri je raztopina indikatorja, tako da je podporna membrana v celoti v stiku z raztopino indikatorja in ni zračnih mehurčkov. Paziti je treba, da pregrada ostane cela.

▼M8

Nanašanje preskusne kemikalije

21. Primerna količina preskusne kemikalije, npr. 500 µl tekoče snovi ali 500 mg fino uprašene trdne snovi (7), se previdno nanese na zgornjo plast membranske pregrade in enakomerno porazdeli. Za vsako preskusno kemikalijo in njene ustrezne kontrole se pripravi ustrezno število ponovljenih vzorcev, npr. štirje (7) (glej odstavke od 23 do 25). Evidentira se čas nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado. Za zagotovitev, da so kratka obdobja jedkosti točno evidentirana, se preskusna kemikalija v viale s ponovljenimi vzorci nanese postopoma.

Meritve prehajanja skozi membransko pregrado

22. Vsaka viala se ustrezno spremlja, evidentira se čas prve spremembe raztopine indikatorja, tj. prehoda skozi pregrado, in določi čas, ki je pretekel med nanosom in prehodom skozi membransko pregrado.

Kontrole

23. Pri preskusih, ki vključujejo uporabo vehikla ali topila s preskusno kemikalijo, mora biti vehikel ali topilo združljivo s sistemom membranske pregrade, tj. ne sme spreminjati celovitosti navedenega sistema ali jedkosti preskusne kemikalije. Kadar se uporabi, je treba kontrolo s topilom (ali vehiklom) preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo, da se dokaže združljivost topila s sistemom membranske pregrade.

24. Pozitivno kontrolo (z jedko snovjo) s srednje jedkim delovanjem, npr. 110 ± 15 mg natrijevega hidroksida (podkategorija jedke snovi 1B po GHS ZN) (7), je treba preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo, da se oceni, ali je delovanje preskusnega sistema sprejemljivo. Druga pozitivna kontrola, ki je iz istega kemijskega razreda kot preskusna kemikalija, je lahko koristna za oceno relativnega potenciala jedkosti jedke preskusne kemikalije. Izbrati je treba pozitivne kontrole s srednjo jedkostjo (npr. podkategorija 1B po GHS ZN), da se zaznajo spremembe v času prehajanja, ki je lahko nedopustno daljši ali krajši od določene referenčne vrednosti, kar lahko kaže, da preskusni sistem ne deluje pravilno. Za ta namen je uporabnost izredno jedkih (podkategorija 1A po GHS ZN) ali nejedkih kemikalij omejena. Z jedko kemikalijo iz podkategorije 1B po GHS ZN bi bilo mogoče zaznati prehiter ali prepočasen prebojni čas. Šibko jedka snov (podkategorija 1C po GHS ZN) bi se lahko uporabila kot pozitivna kontrola za merjenje zmožnosti preskusne metode, da dosledno razlikuje med šibko jedkimi in nejedkimi kemikalijami. Ne glede na uporabljeni pristop je treba sprejemljiv razpon odziva pozitivne kontrole razviti na podlagi razpona prebojnih časov iz preteklih preskusov za uporabljene pozitivne kontrole, kot je srednja vrednost ± 2–3 standardni odkloni. Da se lahko zaznajo odkloni zunaj sprejemljivega razpona, je treba pri vsaki študiji določiti točen prebojni čas za pozitivno kontrolo.

25. Negativno (nejedko) kontrolo, npr. 10-odstotno citronsko kislino ali 6-odstotno propionsko kislino (7), je prav tako treba preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo kot še en ukrep za kontrolo kakovosti, da se dokaže funkcionalna celovitost membranske pregrade.

▼M8

Merila za sprejemljivost študije

26. V skladu z uveljavljenimi časovnimi parametri za vsako od podkategorij jedkosti po GHS ZN se čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado do prehoda skozi pregrado, uporabi za napoved jedkosti preskusne kemikalije. Da se študija šteje za sprejemljivo, morajo sočasne pozitivne kontrole dati pričakovani čas odziva na prehajanje (npr. prebojni čas 8–16 min za natrijev hidroksid, če se uporabi kot pozitivna kontrola), sočasna negativna kontrola ne sme biti jedka, sočasna kontrola s topilom, če se vključi, pa ne sme biti niti jedka niti ne sme spremeniti potenciala jedkosti preskusne kemikalije. Pred redno uporabo metode, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da uporabijo 12 snovi, priporočenih v preglednici 2. Za nove podobne preskusne metode, razvite v okviru te preskusne metode, ki so strukturno in funkcionalno podobne validirani referenčni metodi (14), je treba pred začetkom uporabe nove metode kot predpisanega preskušanja uporabiti predhodno določene standarde izvajanja, da se dokažeta njena zanesljivost in točnost (10).

Razlaga rezultatov in razvrstitev preskusnih kemikalij glede na jedkost

27. Čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado do prehoda skozi pregrado, se uporabi za razvrstitev preskusne kemikalije v podkategorije jedkih snovi po GHS ZN (1) in po potrebi v embalažno skupino ZN (16). Mejne časovne vrednosti za vsako od treh podkategorij jedkih snovi so določene za vsako predlagano preskusno metodo. Pri končnih odločitvah o mejnih časih je treba upoštevati potrebo po zmanjšanju nevarnosti za razvrstitev jedke snovi v prenizko kategorijo (tj. lažno negativne rezultate). V tej smernici za preskušanje je treba uporabiti mejne čase modela Corrositex®, kot je opisan v preglednici 3, saj je to edina preskusna metoda, ki trenutno spada v okvir smernice za preskušanje (7).

Preglednica 3

Napovedni model Corrositex®

Povprečni prebojni čas (v min)		Napoved po GHS ZN ([3])
Preskusne kemikalije iz kategorije 1 ([1]) (določene s preskusom kategorizacije, ki je del metode)	Preskusne kemikalije iz kategorije 2 ([2]) (določene s preskusom kategorizacije, ki je del metode)	
0–3 min	0–3 min	Jedka snov neobvezna podkategorija 1A
> 3 do 60 min	> 3 do 30 min	Jedka snov neobvezna podkategorija 1B
> 60 do 240 min	> 30 do 60 min	Jedka snov neobvezna podkategorija 1C
> 240 min	> 60 min	nejedka

([1]) Preskusne kemikalije z veliko kislo/alkalno rezervo (6).
([2]) Preskusne kemikalije z majhno kislo/alkalno rezervo (6).
([3]) Podkategorije 1A, 1B in 1C po GHS ZN ustrezajo embalažnim skupinam ZN I, II oziroma III.

▼**M8**

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

28. Čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije in pozitivnih kontrol ter njihovega prehoda skozi pregrado, je treba prikazati v obliki preglednice kot posamezne podatke za ponovljene vzorce in srednjo vrednost ± standardni odklon za vsak poskus.

Poročilo o preskusu

29. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi:

— Snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— vir, številka serije, če je na voljo;

— obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

— stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;

— pogoji skladiščenja.

Vehikel:

— identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljena količina;

— utemeljitev izbire vehikla.

Model membranske pregrade in vitro *in uporabljeni protokol, vključno z dokazano točnostjo in zanesljivostjo.*

Preskusni pogoji:

— opis uporabljene naprave in pripravljalnih postopkov;

— vir in sestava uporabljene membranske pregrade *in vitro*;

— sestava in lastnosti raztopine indikatorja;

— metoda zaznavanja;

— količina preskusne kemikalije in kontrolne snovi;

— število ponovljenih vzorcev;

— opis in utemeljitev preskusa kategorizacije glede na časovno merilo;

▼M8

— metoda nanosa;

— časi opazovanja;

— opis uporabljenih meril vrednotenja in razvrščanja;

— dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem kemikalij za preverjanje usposobljenosti.

Rezultati:

— preglednice z neobdelanimi podatki iz posameznih preskusnih in kontrolnih vzorcev za vsak ponovljeni vzorec;

— opisi drugih opaženih učinkov;

— izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.

(3) Poglavje B.40a te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.

(4) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: transkutana električna upornost (TER).

(5) OECD (2015). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(6) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483–524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (št. 99-4495.)

(8) Gordon, V. C., Harvell, J. D., in Maibach, H. I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37–45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (št. 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italija. ATLA 29, 96–97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (peti pregled). (20. september 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication št. 04-4510. Na voljo na: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Na voljo na: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Združeni narodi (ZN) (2013). Priporočila ZN o prevozu nevarnega blaga, Vzorčni predpisi, 18. revidirana izdaja (del, poglavje 2.8), ZN, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (9).

Kemikalija: snov ali zmes.

Sistem za zaznavanje kemikalij: vizualni ali elektronski merilni sistem z raztopino indikatorja, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagira na primer s spremembo barve barvila, ki je indikator pH, ali kombinacije barvil, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagirajo s spremembo barve ali z drugimi vrstami kemijskih ali elektrokemijskih reakcij.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušenih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (9).

GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NJ: nejedko.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

▼**M8**

Ustreznost: opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (9).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Jedkost za kožo *in vivo*: nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼M8

B.66 *IN VITRO* PRESKUSI TRANSAKTIVACIJE S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV

SPLOŠNI UVOD

Smernica OECD za preskušanje na podlagi učinkovitosti

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 455 (2016). Smernica za preskušanje 455 temelji na učinkovitosti, z njo pa je opisana metodologija *in vitro* preskusov transaktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo agonistov in antagonistov estrogenskih receptorjev (v nadaljnjem besedilu: preskusi ER TA). Vključuje več mehanistično in funkcionalno podobnih preskusnih metod za opredelitev agonistov in antagonistov estrogenskih receptorjev (tj. ERα, in/ali ERβ) ter naj bi olajšala razvoj novih podobnih ali prilagojenih preskusnih metod v skladu z načeli za validacijo, določenimi v Smernici OECD za validacijo in mednarodno priznanje novih ali posodobljenih preskusnih metod za oceno nevarnosti (1). Popolnoma validirani referenčni preskusni metodi (Dodatek 2 in Dodatek 3), ki sta podlaga za to smernico za preskušanje na podlagi učinkovitosti, sta:

— preskus transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA) (2) z uporabo celične linije (h) ERα-HeLa-9903 in

— preskus ER TA VM7Luc (3) z uporabo celične linije VM7Luc4E2 ([1]), ki večinoma izraža hERα z določenim prispevkom hERβ(4) (5).

Za razvoj in validacijo podobnih preskusov za isto končno točko nevarnosti so na voljo standardi izvajanja (6) (7) in jih je tudi treba uporabiti. Omogočajo pravočasno spremembo na učinkovitosti temelječe Smernice za preskušanje 455, tako da je mogoče posodobljeni smernici za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, dodati nove podobne preskuse; podobni preskusi bodo sicer dodani šele, ko jih bo OECD pregledala in potrdila, da so v skladu s standardi izvajanja. Preskusi, vključeni v Smernico za preskušanje 455, se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav OECD po rezultatih preskusov v zvezi s transaktivacijo estrogenskih receptorjev, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

Ozadje in načela preskusov, vključenih v to preskusno metodo

2. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje, je bil revidiran leta 2012. Prvotni in revidirani

([1]) Pred junijem 2016 se je ta celična linija imenovala BG1Luc. Celice BG-1 so prvotno opisali Geisinger et al. (1998) (35), pozneje pa so njihove lastnosti opredelili raziskovalci inštituta National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Še ne tako daleč nazaj so odkrili, da obstajata dve varianti celic BG-1, ki ju uporabljajo raziskovalci, tj. BG-1 Fr in BG-1 NIEHS. Poglobljena analiza, ki je vključevala testiranje DNK, teh dveh variant celične linije BG-1, ki so jo izvedli Li in sodelavci (2014) (37), je pokazala, da je BG-1 Fr edinstvena in da BG-1 NIEHS, tj. prvotna celična linija, ki je bila uporabljena za razvoj preskusa, ni celična linija karcinoma jajčnikov pri človeku BG1, temveč je varianta celične linije raka dojke pri človeku, MCF7. Celična linija, uporabljena v preskusu, ki se je prvotno imenovala BG1Luc4E2 (38), se bo zdaj imenovala VM7Luc4E2 („V“ = varianta;„M7“ = celice MCF7). Podobno se bo tudi preskus zdaj imenoval VM7Luc ER TA. Čeprav se s tem spremeni izvor celične linije, na kateri temelji preskus, to ne vpliva na objavljene validacijske študije niti na koristnost in uporabo tega preskusa za presejanje estrogenskih/antiestrogenskih kemikalij.

▼**M8**

temeljni okvir sta kot prilogi vključena v Smernice OECD za standardizirane smernice za preskušanje za ocenjevanje kemikalij glede lastnosti endokrinih motilcev (8). Temeljni okvir zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza posamezni stopnji biološke kompleksnosti. Preskusi transaktivacije ER (TA), opisani v tej preskusni metodi, so raven 2, ki vključuje *preskuse* in vitro*, ki zagotavljajo podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh*. Ta preskusna metoda je za preskuse transaktivacije (TA) *in vitro*, s katerimi se opredelijo agonisti in antagonisti estrogenskih receptorjev (ER).

3. Interakcija med estrogeni in ER lahko vpliva na transkripcijo genov pod nadzorom estrogena, kar lahko povzroči indukcijo ali inhibicijo celičnih procesov, vključno s tistimi, ki so nujni za celično proliferacijo, normalen razvoj zarodka in razmnoževalno funkcijo (9) (10) (11). Motnja normalnih estrogenskih sistemov ima lahko škodljive učinke na normalen razvoj (ontogenezo), reproduktivno zdravje in celovitost razmnoževalnega sistema.

4. Preskusi TA *in vitro* temeljijo na neposredni ali posredni interakciji med snovmi in določenim receptorjem, ki uravnava transkripcijo produkta poročevalskega gena. Taki preskusi se obsežno uporabljajo za oceno izražanja genov, uravnavanega s posebnimi jedrnimi receptorji, kot so ER (12) (13) (14) (15) (16). Predlagani so bili za zaznavanje estrogenske transaktivacije, uravnavane z ER (17) (18) (19). Obstajata najmanj dve večji podvrsti jedrnih ER, tj. α in β, ki sta kodirani z različnimi geni. Zadevni proteini imajo različne biološke funkcije ter različne afinitete za porazdelitev v tkivu in vezavo ligandov (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Jedrni ERα povzroči klasični estrogenski odziv (27) (28) (29) (30), zato je večina modelov, ki se trenutno razvijajo za merjenje aktivacije ali inhibicije ER, specifičnih za ERα. Preskusi se uporabljajo za opredelitev kemikalij, ki aktivirajo (ali zavirajo) ER po vezavi liganda, po kateri se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira poročevalski gen, zaradi česar se poveča celično izražanje označevalnega proteina. Pri teh preskusih se lahko uporabljajo različni odzivi poročevalskega gena. V luciferaznih sistemih luciferazni encim pretvori substrat luciferin v bioluminiscenten produkt, ki ga je mogoče kvantitativno izmeriti z luminometrom. Drugi primeri pogostih poročevalskih genov so fluorescenčni protein in gen *LacZ*, ki kodira β-galaktozidazo, tj. encim, ki lahko pretvori brezbarvni substrat X-gal (5- bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) v moder produkt, ki ga je mogoče kvantificirati s spektrofotometrom. Te poročevalske gene je mogoče hitro in poceni oceniti s preskusnimi kompleti, ki so na voljo na trgu.

5. Z validacijskimi študijami preskusov transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA) in VM7Luc TA sta bili dokazani njuna ustreznost in zanesljivost za predvideni namen (3) (4) (5) (30). Standardi izvajanja za preskuse ER TA, temelječe na luminiscenci, z uporabo celičnih linij dojk so vključeni v ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3). Ti standardi izvajanja so bili prilagojeni tako, da se lahko uporabljajo za preskusa STTA in VM7Luc TA (2).

6. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

▼M8

Obseg in omejitve v zvezi s preskusi TA

7. Ti preskusi so predlagani za namene presejanja in prednostnega razvrščanja, lahko pa zagotovijo tudi mehanistične podatke, ki se lahko uporabijo pri pristopu, temelječem na zanesljivosti dokazov. Z njimi se obravnava TA, povzročena z vezavo kemikalije na ER v sistemu *in vitro*. Tako se rezultati ne smejo neposredno ekstrapolirati na kompleksno signaliziranje in uravnavanje nedotaknjenega endokrinega sistema *in vivo*.

8. TA, povzročena z ER, se šteje za enega od ključnih mehanizmov motenj endokrinega sistema, čeprav obstajajo še drugi mehanizmi, prek katerih lahko pride do takih motenj, vključno z (i) interakcijami z drugimi receptorji in encimskimi sistemi znotraj endokrinega sistema, (ii) sintezo hormonov, (iii) presnovno aktivacijo in/ali inaktivacijo hormonov, (iv) porazdelitvijo hormonov v tarčna tkiva in (v) očistkom hormonov iz telesa. Ti načini delovanja se ne obravnavajo z nobenim od preskusov v okviru te preskusne metode.

9. S to preskusno metodo se obravnava sposobnost kemikalije, da aktivira (tj. deluje kot agonist) in tudi zavira (tj. deluje kot antagonist) od ER odvisno transkripcijo. Nekatere kemikalije lahko, odvisno od vrste celic, delujejo kot agonisti in antagonisti ter so poznane kot selektivni modulatorji estrogenih receptorjev (SERM). Kemikalije, ki so pri teh preskusih negativne, bi se lahko ocenile pri preskusu vezave na ER, preden se ugotovi, da se kemikalija ne veže na receptor. Poleg tega preskusi verjetno dajejo samo informacije o delovanju matične molekule, saj je treba upoštevati omejene presnovne zmogljivosti celičnih sistemov *in vitro*. Glede na to, da so se med validacijo uporabile samo posamezne snovi, uporaba za preskušanje zmesi ni bila obravnavana. Kljub temu je preskusna metoda teoretično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami, UVCB in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi za snov z več sestavinami, UVCB ali zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

10. Informativno so v preglednici 1 navedeni rezultati preskusov agonistov za 34 snovi, ki so bile preskušene v obeh popolnoma validiranih referenčnih preskusnih metodah, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi jih je 26 razvrščenih med dokončne agoniste ER, 8 pa je negativnih na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za vezavo na ER in TA, in/ali uterotropnega preskusa (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). V preglednici 2 so navedeni rezultati preskusov antagonistov za 15 snovi, ki so bile preskušene v obeh popolnoma validiranih referenčnih preskusnih metodah, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi so 4 razvrščene med dokončne/domnevne antagoniste ER, 10 pa je negativnih na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za vezavo na ER in TA (2) (3) (18) (31). Glede podatkov, povzetih v preglednicah 1 in 2, je obstajalo 100-odstotno ujemanje med obema referenčnima preskusnima metodama v zvezi z razvrščanjem vseh snovi razen ene (Mifepristone) za preskus z antagonistom, vse snovi pa so bile pravilno razvrščene med agoniste/antagoniste ER ali negativne. Dodatne informacije o tej skupini kemikalij in dodatnih kemikalijah, preskušenih v preskusih STTA in VM7Luc ER TA med validacijskimi študijami, so na voljo v standardih izvajanja za ERTA (6) (7), Dodatek 2 (preglednice 1, 2 in 3).

▼M8

Preglednica 1

Pregled rezultatov preskusov STTA in VM7Luc ER TA za snovi, preskušene pri obeh preskusih z agonistom in razvrščene med agoniste ER (POZ) ali negativne (NEG)

	Snov	Št. CAS	Preskus (1) STTA			Preskus (2) VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev (4)		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC_{10} (M)	Vrednost PC_{50} (b) (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC_{50} (b), (3) (M)	Drugi ER TA (c)	Vezava na ER	Uterotropno
1	17ß-estradiol (a)	50-28-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiol (a)	57-91-0	POZ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-ethinil estradiol (a)	57-63-6	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POZ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NP	NP
5	19-nortestosteron (a)	434-22-0	POZ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol (a)	599-64-4	POZ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NP
7	4-*terc*-oktilfenol (a)	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POZ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin (a)	520-36-5	POZ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NP
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NP
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POZ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POZ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzil ftalat (a)	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG

▼M8

	Snov	Št. CAS	Preskus ([1]) STTA			Preskus ([2]) VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev ([4])		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC_{10} (M)	Vrednost PC_{50} ([b]) (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	Drugi ER TA ([c])	Vezava na ER	Uterotropno
13	Kortikosteron ([a])	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NP
14	Kumestrol ([a])	479-13-0	POZ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POZ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NP
15	Daidzein ([a])	486-66-8	POZ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POZ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrol ([a])	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POZ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NP
17	Di-n-butil ftalat	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(brez PC_{50})	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NP
19	Estron ([a])	53-16-7	POZ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POZ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genistein ([a])	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POZ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NP
22	Kampferol ([a])	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NP
23	Kepon ([a])	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NP
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NP
25	Linuron ([a])	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NP
26	*Mezo*-heksestrol ([a])	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POZ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NP
27	Metiltestosteron ([a])	58-18-4	POZ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NP

▼M8

	Snov	Št. CAS	Preskus ([1]) STTA			Preskus ([2]) VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev ([4])		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC_{10} (M)	Vrednost PC_{50} ([b]) (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	Drugi ER TA ([c])	Vezava na ER	Uterotropno
28	Morin	480-16-0	POZ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NP
29	Noretinodrel ([a])	68-23-5	POZ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POZ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NP
30	*P,p*'-metoksiklor ([a])	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(brez PC_{50}) ([a])	POZ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NP
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NP
33	Spironolakton ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NP
34	Testosteron	58-22-0	POZ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POZ	NP

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molaren; EC_{50} = srednja efektivna koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; POZ = pozitivno; NP = ni preskušeno; PC_{10} (in PC_{50}) = koncentracija preskusne snovi, pri kateri odziv znaša 10 % (ali 50 % za PC_{50}) odziva, ki ga na posamezni plošči povzroči pozitivni kontrolni vzorec (E2, 1 nm).

([a]) Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile opredeljene kot agonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (ocenjevalno poročilo ICCVAM VM7Luc ER TA, preglednica 4-1 (3).

([b]) Najvišja koncentracija, preskušena brez omejitev zaradi citotoksičnosti ali netopnosti, je bila 1×10^{-5} M (preskus STTA) oziroma 1×10^{-3} M (preskus VM7Luc ER TA).

([c]) V oklepaju je navedeno število rezultatov preskusa, označenih za pozitivne (POZ) ali negativne (NEG), od skupnega števila zajetih študij.

([1]) Vrednosti iz osnutka poročila o predhodni validaciji in medlaboratorijski validaciji preskusa transkripcijske aktivacije (TA) s stabilno transfekcijo za zaznavo estrogenskega delovanja – preskus z reporterskim genom, povzročenim s človeškim estrogenskim receptorjem alfa, z uporabo celične linije hER-HeLa-9903 (2).

([2]) Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): metoda in vitro za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

([3]) Srednje vrednosti EC_{50} so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

([4]) Razvrstitev med agoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja preskusnih metod vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Opombe: Vsak preskus v okviru te preskusne metode nima enakih meritev. V nekaterih primerih EC_{50} ni mogoče izračunati, ker ni dobljena celotna krivulja odziva na odmerek. Medtem ko je pri preskusu STTA vrednost PC_{10} ključna meritev, so možni še drugi primeri, pri katerih PCx zagotovi koristne informacije.

▼M8

Preglednica 2

Primerjava rezultatov preskusov STTA in VM7Luc ER TA za snovi, preskušene pri obeh preskusih z antagonistom in razvrščene med antagoniste ER (POZ) ali negativne (NEG)

	Snov ([a])	Št. CAS	Preskus ER STTA ([1])		Preskus VM7Luc ER TA ([2])		Učinki kandidatne snovi za ER STTA ([4])	Dogovorjena razvrstitev ([5]) ICCVAM	Kemijski razred MeSH ([6])	Skupina proizvodov ([7])
			Delovanje	ER TA Vrednost IC_{50} ([b]) (M)	Delovanje	ER TA Vrednost IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
2	Dibenzo[a,h] antracen	53-70-3	POZ	Brez IC_{50}	POZ	Brez IC_{50}	POZ	DP	policiklična spojina	laboratorijska kemikalija, naravni produkt
3	Mifepriston	84371-65-3	POZ	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	Blago POZ	NEG	steroid	farmacevtsko sredstvo
4	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
5	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	DN	DN	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini

▼M8

	Snov ([a])	Št. CAS	Preskus ER STTA ([1])		Preskus VM7Luc ER TA ([2])		Učinki kandidatne snovi za ER STTA ([4])	Dogovorjena razvrstitev ([5]) ICCVAM	Kemijski razred MeSH ([6])	Skupina proizvodov ([7])
			Delovanje	ER TA Vrednost IC_{50} ([b]) (M)	Delovanje	ER TA Vrednost IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	heterociklična spojina	Barvilo, naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	DN	heterociklična spojina	herbicid
9	Di-n-butil ftalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	ester, ftalna kislina	kozmetična sestavina, industrijska kemikalija, mehčalo
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ni preskušeno	DN	heterociklična spojina, pirimidin	fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	DN	DN	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	DN	amid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	DN	NEG	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt

▼M8

	Snov ([a])	Št. CAS	Preskus ER STTA ([1])		Preskus VM7Luc ER TA ([2])		Učinki kandidatne snovi za ER STTA ([4])	Dogovorjena razvrstitev ([5]) ICCVAM	Kemijski razred MeSH ([6])	Skupina proizvodov ([7])
			Delovanje	ER TA Vrednost IC_{50} ([b]) (M)	Delovanje	ER TA Vrednost IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	P-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ni preskušeno	NEG	fenol	kemijski vmesni produkt
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	DN	NEG	ogljikovodik (ciklični)	naravni produkt

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molaren; IC_{50} = srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; DN = domnevno negativno; POZ = pozitivno; DP = domnevno pozitivno.

([a]) Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile označene kot antagonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) Najvišja koncentracija, preskušena brez omejitev zaradi citotoksičnosti ali netopnosti, je bila 1×10^{-3} M (preskus STTA) oziroma 1×10^{-5} M (preskus VM7Luc ER TA).

([1]) Validacijsko poročilo o preskusu transkripcijske aktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo z ER povzročenega delovanja, del B (2).

([2]) Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): metoda in vitro za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

([3]) Srednje vrednosti IC_{50} so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

([4]) Delovanje ER STTA, o katerem se je sklepalo na podlagi sporočenih učinkov, poznanih iz podatkov centra CERI o preteklih preskusih receptorske vezave ER, uterotropnega preskusa in informacij, zbranih iz javno dostopnih virov (2).

([5]) Razvrstitev med antagoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumenta ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31).

([6]) Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov izdelkov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ELEMENTI PRESKUSA TA ER

Nujni elementi preskusa

11. Ta preskusna metoda se uporablja za preskuse, pri katerih se uporabi stabilno transfecirani ali endogeni receptor ERα in stabilno transfecirani konstrukt poročevalskega gena pod nadzorom enega ali več estrogenskih odzivnih elementov; prisotni pa so lahko tudi drugi receptorji, kot je ERβ. To so nujni elementi preskusa.

Kontrole

12. Opisati je treba podlago za predlagane sočasne referenčne standarde za vsakega od preskusov z agonistom in antagonistom. Sočasne kontrole (negativna, s topilom in pozitivna) se, kakor je ustrezno, uporabljajo kot kazalnik, da preskus deluje v preskusnih pogojih, in zagotavljajo podlago za primerjave med poskusi; običajno spadajo med merila za sprejemljivost posameznega poskusa (1).

Standardni postopki kontrole kakovosti

13. Standardne postopke kontrole kakovosti je treba izvesti, kot je opisano za vsak preskus, za zagotovitev, da celična linija ostane stabilna skozi več pasaž, ne vsebuje mikoplazme (tj. brez bakterijske okužbe) in ohrani sposobnost za zagotovitev pričakovanih z ER povzročenih odzivov v daljšem časovnem obdobju. Poleg tega je treba preveriti pravilno identiteto celičnih linij in prisotnost drugih onesnaževal (npr. gliv, kvasovk in virusov).

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

14. Pred preskušanjem neznanih kemikalij s katerim od preskusov v okviru te preskusne metode mora vsak laboratorij dokazati usposobljenost za uporabo preskusa. Za dokaz usposobljenosti mora preskusiti 14 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so v preglednici 3 navedene za preskus z agonistom, in 10 snovi za preverjanje usposobljenosti iz preglednice 4 za preskus z antagonistom. S tem preverjanjem usposobljenosti se potrdi tudi odzivnost preskusnega sistema. Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti je podskupina referenčnih snovi, navedenih v standardih izvajanja za preskuse ER TA (6). Te snovi so na voljo na trgu, predstavljajo razrede kemikalij, ki se pogosto povezujejo z agonističnim ali antagonističnim delovanjem na ER, imajo primeren razpon jakosti, ki se pričakuje za agoniste/antagoniste ER (tj. močne do šibke), in vključujejo negativne snovi. Preskušanje snovi za preverjanje usposobljenosti je treba ponoviti vsaj dvakrat, in sicer na različna dneva. Usposobljenost se dokaže s pravilno razvrstitvijo (pozitivna/negativna) vsake snovi za preverjanje usposobljenosti. Preverjanje usposobljenosti mora ponoviti vsak tehnik, ko se uči preskusov. Odvisno od vrste celic se lahko nekatere od teh snovi za preverjanje usposobljenosti obnašajo kot SERM ter delujejo kot agonisti in antagonisti. Kljub temu so snovi za preverjanje usposobljenosti v preglednicah 3 in 4 razvrščene glede na poznano prevladujoče delovanje, ki ga je treba uporabiti pri ocenjevanju usposobljenosti.

15. Za dokaz učinkovitosti in za namene kontrole kakovosti mora vsak laboratorij vzpostaviti zbirko podatkov o agonistih in antagonistih iz preteklih preskusov s podatki za referenčni standard (npr. 17β-estradiol in tamoksifen), pozitivne in negativne kontrolne kemikalije in kontrolo s topilom (npr. DMSO). Za začetek je treba zbirko podatkov ustvariti iz vsaj 10 neodvisnih ponovitev z agonisti (npr. 17β-estradiolom) in 10 neodvisnih ponovitev z antagonisti (npr. tamoksifenom). Dodati je treba rezultate iz prihodnjih analiz teh referenčnih standardov in kontrol s topili, da se zbirka podatkov poveča, s čimer se zagotavljata doslednost in učinkovitost biološkega preskusa v laboratoriju v daljšem časovnem obdobju.

▼M8

Preglednica 3

Seznam (14) snovi za preverjanje usposobljenosti za preskus z agonistom [1]

Št. [8]	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv [2]	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH [6]	Skupina proizvodov [7]
				Vrednost PC_{10} (M) [3]	Vrednost PC_{50} (M) [3]	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC_{50} (M) [4]	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) [5]		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	od 10^{-14} do 10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
12	17α-estradiol	57-91-0	POZ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
15	*Mezo*-heksestrol	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
11	4-*terc*-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	fenol	kemijski vmesni produkt
9	Genistein	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
6	Bisfenol A	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	fenol	kemijski vmesni produkt

▼M8

Št. ([8])	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv ([2])	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH ([6])	Skupina proizvodov ([7])
				Vrednost PC_{10} (M) ([3])	Vrednost PC_{50} (M) ([3])	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ([5])		
2	Kemferol	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt
3	Butilbenzil ftalat	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	karboksilna kislina, ester, ftalna kislina	mehčalo, industrijska kemikalija
4	*P,p*'-metoksiklor	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	ogljikovodik (halogenirani)	pesticid, veterinarsko sredstvo
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	karboksilna kislina, fenol	farmacevtsko sredstvo, konzervans
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	od 10^{-10} do 10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	heterociklična spojina	herbicid
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	lakton, steroid	farmacevtsko sredstvo
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	heterociklična spojina	farmacevtsko sredstvo

▼M8

Št. ([8])	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv ([2])	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH ([6])	Skupina proizvodov ([7])
				Vrednost PC_{10} (M) ([3])	Vrednost PC_{50} (M) ([3])	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ([5])		
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	heterociklična spojina, indol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); EC_{50} = srednja efektivna koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; POZ = pozitivno; PC_{10} (in PC_{50}) = koncentracija preskusne snovi, pri kateri odziv znaša 10 % (ali 50 % za PC_{50}) odziva, ki ga na posamezni plošči povzroči pozitivni kontrolni vzorec (E2, 1 nm).

([1]) Razvrstitev med pozitivne ali negativne zaradi delovanja agonista ER je temeljila na dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave ER in TA (31) ter na empiričnih podatkih in drugih informacijah, pridobljenih iz referenčnih študij, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Vrednosti iz osnutka poročila o predhodni validaciji in medlaboratorijski validaciji preskusa transkripcijske aktivacije (TA) s stabilno transfekcijo za zaznavo estrogenskega delovanja – preskus z reporterskim genom, povzročenim s človeškim estrogenskim receptorjem alfa, z uporabo celične linije hER-HeLa-9903 (30).

([3]) Srednje vrednosti EC_{50} so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

([4]) Sporočene koncentracije so bile najvišje preskušene koncentracije (določanje območja) med validacijo preskusa VM7Luc ER TA. Če so se koncentracije med laboratoriji razlikovale, je sporočena najvišja koncentracija. Glej preglednico 4-10 iz ocenjevalnega poročila ICCVAM o preskusni metodi; preskusna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3).

([5]) Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov izdelkov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

([7]) Iz preglednice 1 (seznam referenčnih kemikalij (22) za oceno točnosti agonista ER) standardov izvajanja (6).

([8]) Če snov za preverjanje usposobljenosti ni več na voljo na trgu, se lahko uporabi snov z enako razvrstitvijo ter primerljivo jakostjo, načinom delovanja in kemijskim razredom.

▼M8

Preglednica 4

Seznam (10) snovi za preverjanje usposobljenosti za preskus z antagonistom

	Snov ([a])	Št. CAS	Preskus ER STTA ([2])			Preskus VM7Luc ER TA ([3])			Učinki kandidatne snovi za ER STTA ([2])	Dogovorjena razvrstitev ([6]) ICCVAM	Kemijski razred MeSH ([7])	Skupina proizvodov ([8])
			Delovanje TA ER	IC_{50} (M)	Preskusno območje koncentracije (-M)	Delovanje TA ER	IC_{50} ([4]) (M)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ([5])				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	od 10^{-12} do 10^{-7}	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
2	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	od 10^{-12} do 10^{-7}	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
3	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	od 10^{-10} do 10^{-5}	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	od 10^{-9} do 10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Biti mora negativna (*)	DN	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	od 10^{-9} do 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	heterociklična spojina	Barvilo, naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
6	Di-n-butil ftalat	84-74-2	NEG	—	od 10^{-8} do 10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	ester, ftalna kislina	kozmetična sestavina, industrijska kemikalija, mehčalo

▼M8

	Snov ([a])	Št. CAS	Preskus ER STTA ([2])			Preskus VM7Luc ER TA ([3])			Učinki kandidatne snovi za ER STTA ([2])	Dogovorjena razvrstitev ([6]) ICCVAM	Kemijski razred MeSH ([7])	Skupina proizvodov ([8])
			Delovanje TA ER	IC_{50} (M)	Preskusno območje koncentracije (-M)	Delovanje TA ER	IC_{50} ([4]) (M)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ([5])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	od 10^{-8} do 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	Biti mora negativna (*)	DN	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	od 10^{-9} do 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Biti mora negativna (*)	NEG	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
9	P-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	od 10^{-9} do 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	ni preskušeno	NEG	fenol	kemijski vmesni produkt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	od 10^{-8} do 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	Biti mora negativna (*)	NEG	ogljikovodik (ciklični)	naravni produkt

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molaren; IC_{50} = srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; DN = domnevno negativno; POZ = pozitivno.

(*) Razvrščena kot negativna glede na pregled virov (2).

([a]) Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile označene kot antagonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) Validacijsko poročilo o preskusu transkripcijske aktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo z ER povzročenega delovanja, del B (2).

([2]) Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): metoda in vitro za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

([3]) Srednje vrednosti IC_{50} so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

([4]) Sporočene koncentracije so bile najvišje preskušene koncentracije (določanje območja) med validacijo preskusa VM7Luc ER TA. Če so se koncentracije med laboratoriji razlikovale, je sporočena najvišja koncentracija. Glej preglednico 4-11 iz ocenjevalnega poročila ICCVAM o preskusni metodi; preskusna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3).

([5]) Razvrstitev med antagoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumenta ICCVAM o pregledu ozadja preskusnih metod vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31).

([6]) Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov izdelkov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Merila za sprejemljivost ponovitve preskusa

16. Sprejetje ali zavrnitev ponovitve preskusa temelji na oceni rezultatov, dobljenih za referenčne standarde in kontrole, uporabljene za posamezni poskus. Vrednosti PC_{50} (EC_{50}) ali IC_{50} za referenčne standarde morajo izpolnjevati merila za sprejemljivost, kot so določena za izbrani preskus (za STTA glej Dodatek 2, za VM7Luc ER TA pa Dodatek 3), vse pozitivne/negativne kontrole pa je treba pravilno razvrstiti za vsak sprejeti poskus. Sposobnost dosledne izvedbe preskusa je treba dokazati z oblikovanjem in vzdrževanjem zbirke podatkov iz preteklih preskusov za referenčne standarde in kontrole (glej odstavek 15). Standardni odkloni ali koeficienti variacije (KV) za srednje vrednosti parametrov prileganja krivulj referenčnih standardov iz več poskusov se lahko uporabijo kot merilo za obnovljivost znotraj laboratorija. Poleg tega je treba upoštevati naslednja načela v zvezi z merili za sprejemljivost:

— podatki morajo zadostovati za kvantitativno oceno aktivacije ER (za preskus z agonistom) ali zaviranje ER (za preskus z antagonistom) (tj. učinkovitost in jakost);

— srednja vrednost dejavnosti reporterskega gena za referenčno koncentracijo referenčnega estrogena mora biti vsaj enaka najnižji vrednosti, določeni pri preskusih, glede na dejavnost kontrole z vehiklom (topilom), da se zagotovi ustrezna občutljivost. Za preskuse STTA in VM7Luc ER TA to pomeni štirikratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na posamezni plošči;

— preskušene koncentracije morajo ostati znotraj območja topnosti preskusnih kemikalij in ne smejo biti citotoksične.

Analiza podatkov

17. Za razvrščanje pozitivnega in negativnega odziva je treba za vsak preskus uporabiti opredeljeni postopek za razlago podatkov.

18. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost (odstavek 16) pokaže, da preskus deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljši znak, da so bili dobljeni točni podatki, je ponovitev rezultatov prve ponovitve. Če se z dvema ponovitvama dobijo ponovljivi rezultati (npr. rezultati obeh ponovitev preskusa kažejo, da je preskusna kemikalija pozitivna), tretje ponovitve ni treba izvesti.

19. Če se z dvema ponovitvama ne dobijo ponovljivi rezultati (npr. preskusna kemikalija je pri eni ponovitvi pozitivna, pri drugi pa negativna) ali če se zahteva višja stopnja gotovosti glede rezultata tega preskusa, je treba izvesti vsaj tri neodvisne ponovitve. V takem primeru razvrstitev temelji na dveh ujemajočih se rezultatih od treh.

Splošna merila za razlago rezultatov

20. Trenutno ni splošno sprejete metode za razlago podatkov ER TA. Kljub temu morata kvalitativna (npr. pozitivno/negativno) in/ali kvantitativna (npr. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) ocena z ER povzročenega delovanja temeljiti na empiričnih podatkih in razumni znanstveni presoji. Če je mogoče, morata biti za pozitivne rezultate značilni tako velikost učinka v primerjavi s kontrolo z vehiklom (topilom) ali referenčnim estrogenom kot tudi koncentracija, pri kateri se učinek pojavi (npr. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} itd.).

▼M8

Poročilo o preskusu

21. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskus:

— uporabljeni preskus;

— kontrola/referenčni standard/preskusna kemikalija;

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo/vehikel:

— opredelitev lastnosti (narava, dobavitelj in serija);

— utemeljitev izbire topila/vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana.

Celice:

— vrsta in izvor celic:

  • Ali je ER endogeno izražen? Če ni, kateri receptorji so bili transfecirani?

  • Uporabljeni poročevalski konstrukti (vključno z izvornimi vrstami);

  • transfekcijska metoda;

  • izbirna metoda za vzdrževanje stabilne transfekcije (če je ustrezno);

  • Ali je transfekcijska metoda pomembna za stabilne linije?

— število pasaž celic (od odtajanja);

▼**M8**

— številka pasaže celic ob odtajanju;

— metode vzdrževanja celičnih kultur.

Preskusni pogoji:

— omejitve topnosti;

— opis uporabljenih metod za ocenjevanje viabilnosti;

— sestava gojišč, koncentracija CO_2;

— koncentracije preskusne kemikalije;

— količina dodanega vehikla in preskusne kemikalije;

— inkubacijska temperatura in vlažnost;

— trajanje tretiranja;

— gostota celic ob začetku tretiranja in med njim;

— pozitivni in negativni referenčni standardi;

— poročevalski reagenti (ime izdelka, dobavitelj in serija);

— merila za obravnavanje preskusnih ponovitev kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih.

Preverjanje sprejemljivosti:

— razmerje indukcij za vsako preskusno ploščo in ali ustrezajo minimumu, zahtevanemu s preskusom, na podlagi kontrol iz preteklih preskusov;

— dejanske vrednosti za merila za sprejemljivost, npr. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ in vrednosti Hillovega naklona, za sočasne pozitivne kontrole/referenčne standarde.

Rezultati:

— neobdelani in normalizirani podatki;

— najvišja raven indukcije;

— podatki o citotoksičnosti;

— najnižja efektivna koncentracija, če obstaja;

— vrednosti RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} in/ali EC_{50}, kot je ustrezno;

— razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

▼M8

— statistične analize, če obstajajo, skupaj z meritvijo napake in zaupanja (npr. SEM, SD, CV ali 95 % CI) in opisom, kako so bile te vrednosti dobljene.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 225), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol, P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): str. 5367–73.

(5) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): str. 67–82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 173), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 174), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(9) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: str. 20–6.

(10) Welboren, W. J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): str. 1073–89.

(11) Younes, M., in Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): str. 63–6.

▼**M8**

(12) Jefferson, W. N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): str. 179–189.

(13) Sonneveld, E., *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): str. 173–187.

(14) Takeyoshi, M., *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): str. 91–98.

(15) Combes, R. D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals, 28(1): str. 81–118.

(16) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): str. 1459–69.

(17) Gray, L. E., Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102–103, 677–680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson, J. Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): str. 379–383.

(21) Ogawa, S., *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): str. 122–126.

(22) Enmark, E., *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): str. 4258–4265.

(23) Ball, L. J., *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): str. 204–211.

(24) Barkhem, T., *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): str. 105–12.

(25) Deroo, B. J., in Buensuceso, A. V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): str. 1703–1714.

(26) Harris, D. M., *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): str. 558–568.

(27) Anderson, J. N., Clark, J. H., in Peck, E. J., Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): str. 1460–1468.

▼**M8**

(28) Toft, D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): str. 515–522.

(29) Gorski, J., *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: str. 45–80.

(30) Jensen, E. V., *et al.* (1967). Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): str. 547–569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (št. 03-4505.).

(32) Kanno, J., *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno, J., *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno, J., *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(36) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(37) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072–2081.

(38) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67–82.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

Merila za sprejemljivost: minimalni standardi za učinkovitost poskusnih kontrol in referenčnih standardov. Da se poskus šteje za veljaven, morajo biti izpolnjena vsa merila za sprejemljivost.

Točnost (skladnost): stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost' se pogosto izmenično uporabljata in pomenita delež ustreznih rezultatov preskusa (1).

Agonist: snov, ki ob vezavi na določen receptor povzroči odziv, npr. transkripcijo.

Antagonist: vrsta receptorskega liganda ali kemikalije, ki sama ob vezavi na receptor ne povzroči biološkega odziva, temveč blokira ali zmanjša z agonistom povzročene odzive.

Antiestrogensko delovanje: zmožnost kemikalije, da zavira z estrogenskimi receptorji povzročeno delovanje 17β-estradiola.

Celična morfologija: oblika in videz celic, ki rastejo v monosloju v eni sami jamici plošče s tkivno kulturo. Celice, ki odmirajo, imajo pogosto nenormalno celično morfologijo.

TO: temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

Tretiranje z ogljem/dekstranom: tretiranje seruma, uporabljenega v celični kulturi. Pri tretiranju z ogljem/dekstranom (ki se pogosto imenuje ločevanje) se odstranijo endogeni hormoni in proteini, ki se vežejo na hormone.

Kemikalija: snov ali zmes.

Citotoksičnost: škodljivi učinki na celično strukturo ali funkcijo, ki lahko nazadnje povzročijo celično smrt, pokažejo pa se lahko z zmanjšanjem števila celic v jamici ob koncu obdobja izpostavljenosti ali z zmanjšanjem sposobnosti za merjenje celične funkcije v primerjavi s sočasno kontrolo z vehiklom.

KV: koeficient variacije.

DCC-FBS: fetusni serum goveda, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum).

DMEM: Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče.

DMSO: dimetil sulfoksid.

E2: 17β-estradiol

EC50: srednja efektivna koncentracija preskusne kemikalije.

ED: endokrina motnja.

hERα: človeški estrogenski receptor alfa.

▼M8

hERß: človeški estrogenski receptor beta.

EFM: gojišče, ki ne vsebuje estrogena. Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče (DMEM), ki mu so mu dodani 4,5-odstotni FBS, tretiran z ogljem/dekstranom, 1,9-odstotni L-glutamin in 0,9-odstotna raztopina Pen-Strep.

ER: estrogenski receptor.

ERE: odzivni element za estrogen.

Estrogenska aktivnost: zmožnost kemikalije, da posnema 17β-estradiol pri njegovi sposobnosti vezave na estrogenske receptorje in njihovo aktiviranje. S to preskusno metodo je mogoče zaznati s hERα povzročeno estrogensko aktivnost.

ERTA: transaktivacija estrogenskih receptorjev.

FBS: fetusni serum goveda.

HeLa: nesmrtna človeška celična linija materničnega vratu.

HeLa9903: subklon celice HeLa, v katerega sta bila stabilno transfecirana hERααin luciferazni poročevalski gen.

IC_{50}: srednja efektivna koncentracija inhibitorne preskusne snovi.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod).

Obnovljivost med laboratoriji: merilo, v kakšnem obsegu lahko različni usposobljeni laboratoriji z uporabo istega protokola in preskušanjem istih snovi dobijo kvalitativno in kvantitativno podobne rezultate. Obnovljivost med laboratoriji se ugotovi med postopki pred validacijo in med njo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi obnovljivost v različnih laboratorijih (1).

Obnovljivost v laboratoriju: določitev, v kakšnem obsegu lahko usposobljene osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola ob različnih časih. Imenuje se tudi obnovljivost znotraj laboratorija (1).

LEC: (Lowest Effective Concentration) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči odziv (tj. najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se razmerje indukcije statistično razlikuje od sočasne kontrole z vehiklom).

Podoben preskus: pogovorni izraz za preskus, ki je strukturno in funkcionalno podoben validirani in sprejeti referenčni preskusni metodi. Uporablja se kot sopomenka za podobno preskusno metodo.

MT: metalotionein.

MMTV: virus tumorja mlečne žleze pri miših.

OHT: 4-hidroksitamoksifen.

PBTG: smernica za preskušanje na podlagi učinkovitosti.

▼M8

PC (pozitivna kontrola): močno aktivna snov, po možnosti 17ß-estradiol, ki je vključena v vse preskuse, da pomaga zagotoviti pravilno delovanje preskusa.

PC_{10}: koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je izmerjena aktivnost pri preskusu z agonistom enaka 10 % največje aktivnosti, povzročene s pozitivno kontrolo (E2 pri 1nM za preskus STTA) na posamezni plošči.

PC_{50}: koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je izmerjena aktivnost pri preskusu z agonistom enaka 50 % največje aktivnosti, povzročene s pozitivno kontrolo (E2 pri referenčni koncentraciji, določeni pri preskusni metodi) na posamezni plošči.

PC_{Max}: koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči RPCMax.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validiranem preskusu in so podlaga za oceno primerljivosti predlaganega preskusa, ki je funkcijsko in mehanistično podoben. Vključujejo: (1) nujne elemente preskusa; (2) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljivega izvajanja validirane preskusne metode, ter (3) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagani preskus pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (1).

Snovi za preverjanje usposobljenosti: podskupina referenčnih snovi, vključenih v standarde izvajanja, ki jih lahko laboratoriji uporabijo za dokazovanje tehnične usposobljenosti s standardizirano preskusno metodo. Običajno so med merili za izbor teh snovi: da predstavljajo celoten razpon odzivov, da so na voljo na trgu in da so zanje na voljo visokokakovostni referenčni podatki.

Usposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno izvedbo preskusa pred preskušanjem neznanih snovi.

Referenčni estrogen (pozitivna kontrola, PC): 17β-estradiol (E2, št. CAS 50-28-2).

Referenčni standard: referenčna snov, s katero se dokaže ustreznost preskusa. Za preskuse STTA in VM7Luc ER TA je referenčni standard 17β-estradiol.

Referenčne preskusne metode: preskusi, na katerih temelji PBTG 455.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni, v kakšnem obsegu se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (1).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih.

RLU: relativne svetlobne enote.

RNK: ribonukleinska kislina.

RPC_{Max}: najvišja raven odziva, ki ga povzroči preskusna kemikalija, izražena kot delež odziva, ki ga povzroči 1 nM E2 na isti plošči.

▼M8

RPMI: gojišče RPMI 1 640 z dodanima 0,9-odstotno raztopino Pen-Strep in 8,0-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS).

Ponovitev: posamezen poskus, s katerim se oceni kemijsko delovanje na biološki rezultat preskusa. Vsaka ponovitev je popoln poskus, opravljen na jamicah s ponovljenimi vzorci celic, hkrati nasajenih iz skupne zaloge celic.

Neodvisna ponovitev: ločen, neodvisen poskus, s katerim se oceni kemijsko delovanje na biološki rezultat preskusa, pri katerem se uporabijo celice iz druge zaloge in sveže razredčene kemikalije, ter ki je izveden na različne dneve ali pa ga na isti dan izvedejo različni člani osebja.

SO: standardni odklon.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih snovi, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (1).

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih snovi, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (1).

Stabilna transfekcija: ko se DNK transfecira v gojene celice tako, da se stabilno integrira v genom celic, kar povzroči stabilno izražanje transfeciranih genov. Kloni stabilno transfeciranih celic se izberejo s stabilnimi označevalci (npr. odpornost proti G418).

Preskus STTA: preskus transaktivacije s stabilno transfekcijo (Stably Transfected Transactivation Assay), preskus transkripcijske aktivacije ERα z uporabo celične linije HeLa 9 903.

Študija: vse vrste eksperimentalnega dela, namenjene oceni ene specifične snovi z uporabo specifičnega preskusa. Študija zajema vse korake, vključno s preskusi redčenja preskusne snovi v preskusnem mediju, predhodnimi ponovitvami za določanje območja, vsemi potrebnimi celovitimi ponovitvami, podatkovnimi analizami, zagotavljanjem kakovosti, ocenami citotoksičnosti itd. Dokončanje študije omogoča razvrstitev aktivnosti preskusne kemikalije na tarči toksičnosti (tj. aktivna, neaktivna ali neopredeljiva), ki se ocenjuje z uporabljenim preskusom, in oceno jakosti glede na pozitivno referenčno kemikalijo.

Snov: v skladu z uredbo REACH ([1]) je snov opredeljena kot kemijski element in njegove spojine v naravnem stanju ali pridobljene s kakršnim koli proizvodnim procesom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev njene obstojnosti, in vsemi nečistotami, ki nastanejo pri uporabljenem procesu, ne vključuje pa topil, ki se lahko izločijo, ne da bi to vplivalo na obstojnost snovi ali spremenilo njeno sestavo. Zelo podobna opredelitev se uporablja v okviru GHS ZN (1).

TA (Transaktivacija): začetek sinteze mRNK v odziv na določen kemični signal, kot je vezava estrogena na estrogenski receptor.

([1]) Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES (UL L 304, 22.11.2007, str. 1).

▼M8

Preskus: v okviru te preskusne metode je preskus ena od metodologij, ki so sprejete kot metodologije, ki veljavno izpolnjujejo začrtana merila za učinkovitost. Med elementi preskusa so na primer specifična celična linijo s povezanimi rastnimi pogoji, specifični medij, v katerem poteka preskus, pogoji priprave plošče, razporeditev in razredčine preskusnih kemikalij skupaj z morebitnimi drugimi potrebnimi ukrepi za kontrolo kakovosti ter s tem povezanimi koraki za oceno podatkov.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Transkripcija: sinteza mRNK.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

Validirana preskusna metoda: preskus, za katerega sta bili na podlagi končanih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (1).

Validacija: postopek, s katerim se določita zanesljivost in ustreznost posameznega pristopa, metode, preskusa, postopka ali ocene za opredeljen namen (1).

Kontrola z vehiklom: topilo, ki se uporabi za raztopitev preskusne in kontrolne kemikalije, se preskusi izključno kot vehikel brez raztopljene kemikalije.

VM7: nesmrtna celica adenokarcinoma, ki endogeno izraža estrogenski receptor.

VM7Luc4E2: celična linija VM7Luc4E2 je bila pridobljena iz nesmrtnih človeških celic adenokarcinoma VM7, ki endogeno izražajo obe obliki estrogenskih receptorjev (ERα in ERβ) in so bile stabilno transfecirane s plazmidom pGudLuc7.ERE. Ta plazmid vsebuje štiri kopije sintetičnega oligonukleotida, ki vsebuje odzivni element za estrogen nad promotorjem virusa tumorja mlečne žleze pri miši (MMTV) in kresničkin luciferazni gen.

Šibka pozitivna kontrola: šibko aktivna snov, izbrana s seznama referenčnih kemikalij, ki je vključena v vse preskuse, da pomaga zagotoviti pravilno delovanje preskusa.

▼**M8**

Dodatek 2

PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ČLOVEŠKEGA ESTROGENSKEGA RECEPTORJA-A S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO ESTROGENSKEGA AGONISTIČNEGA IN ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA KEMIKALIJ Z UPORABO CELIČNE LINIJE HERA-HELA-9903

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem preskusu transaktivacije (TA) se celična linija hERα-HeLa-9903 uporablja za zaznavo estrogenskega agonističnega delovanja, povzročenega s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hERα). Validacijska študija preskusa transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA), ki jo je japonski inštitut za ocenjevanje in raziskovanje kemikalij (CERI) izvedel z uporabo celične linije hERα-HeLa-9903 za zaznavo estrogenskega agonističnega in antagonističnega delovanja, povzročenega s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hERα), je pokazala ustreznost in zanesljivost preskusa za predvideni namen (1).

2. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hERα povzročene TA z merjenjem kemiluminiscence kot končne točke. Zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena se je o nereceptorsko povzročenih luminiscenčnih signalih sicer poročalo pri koncentracijah fitoestrogena, višjih od 1 μM (2) (3). Čeprav krivulja odziva na odmerek kaže, da do dejanske aktivacije sistema ER pride pri nižjih koncentracijah, je treba izražanje luciferaze, dobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti v sistemih preskusa ER TA s stabilno transfekcijo (Dodatek 1).

3. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka „SPLOŠNI UVOD“ in „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 2.1.

NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

4. Preskus se uporablja za signaliziranje vezave estrogenskega receptorja z ligandom. Po vezavi liganda se kompleks receptor-ligand premesti na jedro, kjer se veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira kresničkin luciferazni poročevalski gen, kar povzroči povečano celično izražanje luciferaznega encima. Luciferin je substrat, ki ga luciferazni encim pretvori v bioluminiscentni produkt, ki ga je mogoče kvantitativno izmeriti z luminometrom. Luciferazno aktivnost je mogoče hitro in poceni oceniti s številnimi preskusnimi kompleti, ki so na voljo na trgu.

5. Preskusni sistem uporablja celično linijo hERα-HeLa-9903, pridobljeno iz tumorja človeškega maternicnega vratu, z dvema stabilno vstavljenima konstruktoma: (i) konstruktom za izražanje hERαα (ki kodira celotno dolžino človeškega receptorja) in (ii) reporterskim konstruktom kresničkine luciferaze, ki nosi pet tandemskih ponovitev elementa, ki se odziva na estrogen (ERE), vitelogenina, ki ga sproži element TATA promotorja metalotioneina pri miših (MT). Genski konstrukt MT TATA pri miših se je izkazal kot najučinkovitejši in se pogosto uporablja. Posledično lahko ta celična linija hERα-HeLa-9903 meri sposobnost preskusne kemikalije, da sproži s hERα povzročeno transaktivacijo izražanja luciferaznega gena.

▼M8

6. V primeru preskusa z agonistom ER je razlaga rezultatov odvisna od tega, ali je najvišja stopnja odziva, povzročenega s preskusno kemikalijo, večja ali enaka odzivu agonista, ki znaša 10 % odziva, povzročenega z najvišjo koncentracijo (1 nM) pozitivne kontrole (PC), tj. 17β-estradiola (E2) (tj. PC10). V primeru preskusa z antagonistom ER je razlaga podatkov odvisna od tega, ali odziv pokaže vsaj 30-odstotno zmanjšanje aktivnosti v primerjavi z odzivom, ki ga sproži eksogena sintetična kontrola (*spike in*) (25 pM E2) brez citotoksičnosti. Analiza in razlaga podatkov sta podrobno obravnavani v odstavkih 34–48.

POSTOPEK

Celične linije

7. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo hERα-HeLa-9903. Celično linijo je mogoče po podpisu sporazuma o prenosu materiala dobiti od celične banke Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) ([1]).

8. Pri preskušanju se lahko uporabijo samo celice, za katere velja, da so brez mikoplazme. Priporočena metoda za občutljivo zaznavo okužbe z mikoplazmo je RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času) (4) (5) (6).

Stabilnost celične linije

9. Za spremljanje stabilnosti celične linije je treba uporabiti E2, 17α-estradiol, 17α-metiltestosteron in kortikosteron kot referenčne standarde za preskus z agonistom, celotno krivuljo odziva na odmerek v območju preskusne koncentracije, navedenem v preglednici 1, pa je treba izmeriti vsaj enkrat ob vsaki izvedbi preskusa, pri čemer se morajo rezultati ujemati z rezultati, navedenimi v preglednici 1.

10. V primeru preskusa z antagonistom je treba sočasno z vsako ponovitvijo izmeriti celotni krivulji koncentracije za dva referenčna standarda, in sicer tamoksifen in flutamid. Spremljati je treba pravilno kvalitativno razvrstitev obeh kemikalij med pozitivne ali negativne.

Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na ploščo

11. Celice je treba vzdrževati v Eagleovem minimalnem osnovnem gojišču (EMEM) brez fenol rdečega, dopolnjenem s 60 mg/l antibiotika kanamicina in 10-odstotnim fetusnim serumom goveda, tretiranim z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC-FBS), v inkubatorju s CO2 (5 % CO2) pri 37 ± 1°C. Ko je dosežena 75–90-odstotna konfluentnost, se lahko celice kultivirajo na novem gojišču v 10 ml 0,4 x 105 – 1 x 105 celic/ml za 100-milimetrsko posodico za gojenje celičnih kultur. Celice je treba suspendirati z 10-odstotnim FBS-EMEM (kar je enako kot EMEM z DCC-FBS) in jih nato nasaditi v jamice mikrotitrske plošče z gostoto 1 x 104 celic/(100 µl x jamica). Nato je treba celice predinkubirati v inkubatorju s 5 % CO2 pri 37 ± 1°C tri ure pred izpostavitvijo kemikaliji. V plastičnih posodah ne sme biti estrogenskega delovanja.

12. Da se ohrani celovitost odziva, je treba celice iz zamrznjene zaloge več kot eno pasažo gojiti v kondicioniranem gojišču, ne smejo pa biti gojene več kot 40 pasaž. Za celično linijo hERα-HeLa-9903 to pomeni manj kot tri mesece. Vendar se lahko učinkovitost celic zmanjša, če rastejo v neprimernih pogojih za gojenje.

([1]) Celična banka JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonska; telefaks: +81 726419812.

▼M8

13. DCC-FBS se lahko pripravi, kot je opisano v Dodatku 2.2, ali pridobi iz komercialnih virov.

Merila za sprejemljivost

Pozitivni in negativni referenčni standardi za preskus z agonistom ER

14. Pred študijo in med njo je treba odzivnost preskusnega sistema preveriti z uporabo ustreznih koncentracij močnega estrogena: E2, šibkega estrogena (17α-estradiol), zelo šibkega agonista (17α-metiltestosteron) in negativne snovi (kortikosteron). Vrednosti sprejemljivega razpona, izpeljane iz validacijske študije (1), so navedene v preglednici 1. Te štiri sočasne referenčne standarde je treba vključiti v vsak poskus, rezultati pa morajo biti znotraj navedenih sprejemljivih mejnih vrednosti. V nasprotnem primeru je treba ugotoviti vzrok za neizpolnjevanje meril za sprejemljivost (npr. ravnanje s celicami ter serum in antibiotiki za kakovost in koncentracijo) in preskus ponoviti. Ko so dosežena merila za sprejemljivost, je za zagotovitev minimalne variabilnosti vrednosti EC_{50}, PC_{50} in PC_{10} bistvena dosledna uporaba materialov za gojenje celic. Vsi štirje sočasni referenčni standardi, ki jih je treba vključiti v vsak poskus (izveden pod enakimi pogoji, vključno z materiali, ravnjo pasaže celic in tehniki), lahko zagotovijo občutljivost preskusa, ker morajo biti vrednosti PC_{10} treh pozitivnih referenčnih standardov znotraj sprejemljivega razpona, tako kot tudi vrednosti PC_{50} in EC_{50}, kadar jih je mogoče izračunati (glej preglednico 1).

Preglednica 1

Vrednosti sprejemljivega razpona štirih referenčnih standardov za preskus z agonistom ER

Ime	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillov naklon	Razpon preskusa
17β-estradiol (E2) št. CAS: 50-28-2	od –11,4 do ~ –10,1	< –11	od –11,3 do ~ –10,1	od 0,7 do ~ 1,5	od 10^{-14}do ~ 10^{-8}M
17α-estradiol št. CAS: 57-91-0	od –9,6 do ~ –8,1	od –10,7 do ~ –9,3	od –9,6 do ~ –8,4	od 0,9 do ~ 2,0	od 10^{-12}do ~ 10^{-6}M
Kortikosteron št. CAS: 50-22-6	—	—	—	—	od 10^{-10}do ~ 10^{-4}M
17α-metiltestosteron št. CAS: 58-18-4	od –6,0 do ~ –5,1	od –8,0 do ~ –6,2	—	—	od 10^{-11}do ~ 10^{-5}M

Pozitivni in negativni referenčni standardi pri preskusu z antagonistom ER

15. Pred študijo in med njo je treba odzivnost preskusnega sistema preveriti z uporabo ustreznih koncentracij pozitivne snovi (tamoksifena) in negativne snovi (flutamida). Vrednosti sprejemljivega razpona, izpeljane iz validacijske študije (1), so navedene v preglednici 2. Ta dva sočasna referenčna standarda je treba vključiti v vsak poskus, rezultate pa je treba šteti za pravilne, kot je prikazano v merilih. V nasprotnem primeru je treba ugotoviti vzrok za neizpolnjevanje meril (npr. ravnanje s celicami ter serum in antibiotiki za kakovost in koncentracijo) in preskus ponoviti. Poleg tega je treba izračunati vrednosti IC_{50} za pozitivno snov (tamoksifen), rezultati pa morajo biti znotraj navedenih sprejemljivih mejnih vrednosti. Ko so dosežena merila za sprejemljivost, je za zagotovitev minimalne variabilnosti vrednosti IC50 bistvena dosledna uporaba materialov za gojenje celic. Občutljivost preskusa lahko zagotovita oba sočasna referenčna standarda, ki ju je treba vključiti v vsak poskus (izveden pod enakimi pogoji, vključno z materiali, ravnjo pasaže celic in tehniki) (glej preglednico 2).

▼M8

Preglednica 2

Merila in vrednosti sprejemljivega razpona obeh referenčnih standardov za preskus z antagonistom ER

Ime	Merila	$LogIC_{50}$	Razpon preskusa
Tamoksifen št. CAS: 10540-29-1	Pozitivno: izračunati je treba IC50	od –5,942 do ~ –7,596	od 10-10 do ~ 10-5 M
Flutamid št. CAS: 13311-84-7	Negativno: izračunati je treba IC30	—	od 10-10 do ~ 10-5 M

Pozitivna kontrola in kontrola z vehiklom

16. Pozitivno kontrolo (PC) za preskus z agonistom ER (1 nM E2) in preskus z antagonistom ER (10 μM TAM) je treba preskusiti v vsaj treh ponovitvah na vsaki plošči. Vehikel, v katerem se raztopi preskusna kemikalija, je treba preskusiti kot kontrolo z vehiklom (VC) v vsaj treh ponovitvah na vsaki plošči. Če se pri pozitivni kontroli uporabi drug vehikel kot za preskusno kemikalijo, je treba poleg te kontrole z vehiklom v vsaj treh ponovitvah na isti plošči s pozitivno kontrolo preskusiti še drugo kontrolo z vehiklom.

Merila kakovosti za preskus z agonistom ER

17. Srednja vrednost luciferazne aktivnosti pozitivne kontrole (1 nM E2) mora biti vsaj 4-kratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na vsaki plošči. To merilo je določeno na podlagi zanesljivosti vrednosti končnih točk iz validacijske študije (pri preteklih preskusih med 4- in 30-kratnikom).

18. Kar zadeva kontrolo kakovosti preskusa, mora biti razmerje indukcije, ki ustreza vrednosti PC10 sočasne pozitivne kontrole (1 nM E2), večje od 1 + 2 standardnega odklona (SD) vrednosti razmerja indukcije (= 1) sočasne kontrole z vehiklom. Za namene prednostnega razvrščanja je lahko vrednost PC10 koristna za poenostavitev potrebne podatkovne analize v primerjavi s statistično analizo. Čeprav statistična analiza zagotovi podatke o statistični značilnosti, taka analiza ni kvantitativni parameter v zvezi s potencialom na podlagi koncentracije, zato je manj koristna za namene prednostnega razvrščanja.

Merila kakovosti za preskus z antagonistom ER

19. Srednja vrednost luciferazne aktivnosti eksogene sintetične kontrole (*spike-in*) (25 nM E2) mora biti vsaj 4-kratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na vsaki plošči. To merilo je določeno na podlagi zanesljivosti vrednosti končnih točk iz validacijske študije.

20. Kar zadeva kontrolo kakovosti preskusa, mora biti relativna transkripcijska aktivacija (RTA) 1 nM E2 večja od 100 %, RTA 1μM 4-hidroksitamoksifena (OHT) mora znašati manj kot 40,6 %, RTA 100 μM digitonina (Dig) pa mora znašati manj kot 0 %.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku „„ELEMENTI PRESKUSA ER TA“ te preskusne metode)

Vehikel

21. Kot sočasno kontrolo z vehiklom je treba uporabiti dimetil sulfoksid (DMSO) ali ustrezno topilo pri enaki koncentraciji, kot se uporablja za različne pozitivne in negativne kontrole ter preskusne kemikalije. Preskusne kemikalije je treba raztopiti v topilu, v katerem je topna zadevna preskusna kemikalija in ki se meša s celičnim gojiščem. Primerni vehikli so voda, etanol (od 95- do 100-odstotna čistost) in DMSO. Če se uporabi DMSO, raven ne sme preseči 0,1 vol. %. Za vsak vehikel je treba dokazati, da največja uporabljena količina ni citotoksična in ne moti učinkovitosti preskusa.

▼M8

Priprava preskusnih kemikalij

22. Na splošno je treba preskusne kemikalije raztopiti v DMSO ali drugem primernem topilu in jih zaporedoma razredčiti z istim topilom v običajnem razmerju 1: 10, da se pripravijo raztopine za redčenje z medijem.

Topnost in citotoksičnost: preudarki glede določanja območja

23. Izvesti je treba predhodni preskus, da se ugotovi ustrezno območje koncentracije kemikalije, ki se preskuša, in preveri, ali bi se lahko za preskusno kemikalijo pojavile težave s topnostjo in citotoksičnostjo. Kemikalije se najprej preskusijo do največje koncentracije 1 µl/ml, 1 mg/ml ali 1 mM, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij. Glede na stopnjo citotoksičnosti ali pomanjkanje topnosti, opaženo v predhodnem preskusu, je treba pri prvi dokončni ponovitvi kemikalijo preskusiti z logaritemskimi zaporednimi razredčinami, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM, 100µM, 10µM itd.), in zapisati morebitno motnost, oborino ali citotoksičnost. Koncentracije pri drugi, in če je potrebno, tretji ponovitvi je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje opredeli krivulja odziva na koncentracijo in preprečijo koncentracije, za katere se ugotovi, da niso topne ali da povzročajo preveliko citotoksičnost.

24. Pri agonistih in antagonistih ER se lahko zaradi naraščajočih ravni citotoksičnosti bistveno spremeni ali odpravi značilni sigmoidni odziv, kar je treba upoštevati pri razlagi podatkov. Uporabiti je treba metode preskušanja citotoksičnosti, ki lahko zagotovijo informacije v zvezi z 80-odstotno viabilnostjo celic, pri čemer se na podlagi izkušenj laboratorija uporabi ustrezen preskus.

25. Če rezultati preskusa citotoksičnosti pokažejo, da se je zaradi koncentracije preskusne kemikalije število celic zmanjšalo za 20 % ali več, je treba to koncentracijo šteti za citotoksično, koncentracije, ki so enake citotoksični koncentraciji ali višje od nje, pa je treba izključiti iz ocene.

Izpostavitev kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči

26. Postopek redčenja kemikalije (1. in 2. korak) in izpostavitve celicam (3. korak) se lahko izvede, kot je opisano v nadaljevanju.

1. korak Vsako preskusno kemikalijo je treba zaporedno razredčiti v DMSO ali ustreznem topilu in dodati v jamice na mikrotitrski plošči, da se dosežejo končne zaporedne koncentracije, kot so določene s predhodnim preskusom za določanje območja (običajno v nizu 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM in 10 pM (od 10^{-3} do 10^{-11} M)), za preskušanje v treh ponovitvah.

2. korak Redčenje kemikalije: najprej razredčite 1,5 µl preskusne kemikalije v topilu do količine 500 µl medija.

3. korak Izpostavitev celic kemikaliji: dodajte 50 µl razredčine z medijem (pripravljene v 2. koraku) v preskusno jamico, ki vsebuje 10^4 celic/100 µl/jamico.

Priporočena končna količina medija, potrebna za vsako jamico, je 150 µl. Preskusni vzorci in referenčni standardi se lahko razvrstijo, kot je prikazano v preglednicah 3 in 4.

▼M8

Preglednica 3

Primer razvrstitve referenčnih standardov glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z agonistom ER

Vrstica	17α-metiltestosteron			Kortikosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

27. Referenčne standarde (E2, 17α-estradiol, 17-μετιλτεστοστερονμινικορτικοστερονκκφεετρεβαεπρεσκυσιτιππριππσακισπονοπιτιιιπρεγλεδνιχαπππππNa vsako preskusno ploščo je treba vključiti jamice s pozitivno kontrolo, tretirane z 1 nM E2, ki lahko povzroči največjo indukcijo E2, in jamice z VC, tretirane samo z DMSO (ali ustreznim topilom) (preglednica 4). Če se pri istem poskusu uporabijo celice iz različnih virov (npr. različna številka pasaže, različna serija itd.), je treba referenčne standarde preskusiti za vsak vir celic.

Preglednica 4

Primer razvrstitve preskusnih kemikalij in kemikalij za kontrolo plošč glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z agonistom ER

Vrstica	Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2			Preskusna kemikalija 3			Preskusna kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼M8

Vrstica	Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2			Preskusna kemikalija 3			Preskusna kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

Preglednica 5

Primer razvrstitve referenčnih standardov glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z antagonistom ER

Vrstica	Tamoksifen			Flutamid			Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO), PC: pozitivna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hidroksitamoksifen, dig: digitonin.

= z dodatkom 25 pM E2.

28. Za oceno antagonističnega delovanja kemikalij je treba preskusnim jamicam v vrsticah od A do G dodati 25 pM E2. Referenčna standarda (tamoksifen in flutamid) je treba preskusiti pri vsaki ponovitvi. Na vsako preskusno ploščo je treba vključiti jamice s pozitivno kontrolo, tretirane z 1 nM E2, ki se lahko uporabijo za kontrolo kakovosti celične linije hERα-HeLa-9903, jamice s kontrolo z vehiklom, tretirane z DMSO (ali ustreznim topilom), jamice z 0,1 % DMSO, tretirane z dodanim DMSO v dodatku E2, ki ustreza eksogeni sintetični kontroli (Spike-in-control), jamice, tretirane s končno koncentracijo 1 µM OHT, in jamice, tretirane s 100 µM Dig (preglednica 5). Naslednja preskusna plošča mora imeti enako razporeditev, a brez jamic z referenčnimi standardi (preglednica 6). Če se pri istem poskusu uporabijo celice iz različnih virov (npr. različna številka pasaže, različna serija itd.), je treba referenčne standarde preskusiti za vsak vir celic.

▼M8

Preglednica 6

Primer razvrstitve preskusnih kemikalij in kemikalij za kontrolo plošč glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z antagonistom ER

Vrstica	Tamoksifen			Flutamid			Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO), PC: pozitivna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hidroksitamoksifen, dig: digitonin.

= z dodatkom 25 pM E2.

29. Potrditi je treba neobstoj učinkov robov, če je ustrezno, če pa se sumi, da ti obstajajo, je treba spremeniti razporeditev plošče, da se taki učinki preprečijo. Uporabi se lahko na primer razporeditev na plošči, pri kateri ni robnih jamic.

30. Po dodajanju kemikalij je treba preskusne plošče od 20 do 24 ur inkubirati v inkubatorju s 5 % CO2 pri 37 ± 1°C, da se povzroči nastanek produktov poročevalskega gena.

31. Posebni preudarki so potrebni pri spojinah, ki so zelo hlapne. V takih primerih lahko kontrolne jamice v bližini dajo lažno pozitivne rezultate, kar je treba upoštevati glede na pričakovane vrednosti in vrednosti kontrol pri preteklih preskusih. V redkih primerih, ko je hlapnost lahko problematična, je mogoče z uporabo „tesnil“ za plošče med preskušanjem učinkovito izolirati posamezne jamice, zato je v takih primerih njihova uporaba priporočljiva.

32. Ponovitve dokončnih preskusov za isto kemikalijo je treba izvesti na različne dneve, da se zagotovi neodvisnost.

Preskus z luciferazo

33. Za preskus se lahko uporabi na trgu dostopen luciferazni reagent (npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ali enakovreden)) ali standardni sistem preskusa z luciferazo (npr. Promega, E1500 ali enakovreden), če so izpolnjena merila za sprejemljivost. Preskusne reagente je treba izbrati na podlagi občutljivosti luminometra, ki bo uporabljen. Kadar se uporabi standardni sistem preskusa z luciferazo, je treba pred dodajanjem substrata uporabiti lizni reagent za celično kulturo (npr. Promega, E1531 ali enakovreden). Luciferazni reagent je treba nanesti po navodilih proizvajalca.

ANALIZA PODATKOV

Preskus z agonistom ER

34. V primeru preskusa z agonistom ER, katerega cilj je dobiti relativno transkripcijsko aktivnost za pozitivno kontrolo (1 nM E2), se lahko luminiscenčni signali z iste plošče analizirajo v korakih, opisanih v nadaljevanju (sprejemljivi so tudi drugi enakovredni matematični postopki).

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom.

▼M8

2. korak Od vrednosti za posamezno jamico odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom, da normalizirate podatke.

3. korak Izračunajte srednjo vrednost za normalizirano pozitivno kontrolo.

4. korak Normalizirano vrednost vsake jamice na plošči delite s srednjo vrednostjo normalizirane pozitivne kontrole (pozitivna kontrola = 100 %).

Končna vrednost vsake jamice je relativna transkripcijska aktivnost za zadevno jamico v primerjavi z odzivom pozitivne kontrole.

5. korak Izračunajte srednjo vrednost relativne transkripcijske aktivnosti za vsako skupino koncentracije preskusne kemikalije. Dimenziji odziva sta dve: izračunana povprečna transkripcijsko aktivnost (odziv) in koncentracija, pri kateri pride do odziva (glej naslednji oddelek).

Preudarki v zvezi z indukcijo EC_{50}, PC_{50} in PC_{10}

35. Za izračun EC50 je potrebna celotna krivulja odziva na koncentracijo, vendar to morda ni vedno dosegljivo ali praktično zaradi omejitev razpona preskusnih koncentracij (na primer zaradi težav s toksičnostjo ali topnostjo). Ker pa sta EC50 in najvišja raven indukcije (ki ustreza zgornji vrednosti Hillove enačbe) informativna parametra, ju je treba po možnosti navesti. Za izračun EC50 in najvišje ravni indukcije je treba uporabiti ustrezno statistično programsko opremo (npr. Graphpad Prism). Če se lahko Hillova logistična enačba uporabi za podatke o odzivu na koncentracijo, je treba EC50 izračunati z naslednjo enačbo (7):

Y= dno + (vrh-dno)/(1 + 10 eksp ((log EC50 – X) x Hillov naklon)), kjer je:

X logaritem koncentracije in

Y odziv, pri čemer se Y začne na dnu in gre do vrha na sigmoidni krivulji. Dno je v Hillovi logistični enačbi določeno pri nič.

36. Za vsako preskusno kemikalijo je treba zagotoviti naslednje:

RPCMax, ki je najvišja stopnja odziva, povzročenega s preskusno kemikalijo, izražena kot delež odziva, povzročenega z 1 nM E2 na isti plošči, in PC_{Max} (koncentracija, povezana z RPCMax); in

za pozitivne kemikalije koncentracije, ki povzročijo PC10, in če je ustrezno, PC50.

37. Vrednost PCx se lahko izračuna z interpolacijo med dvema točkama na koordinati X-Y, pri čemer je ena tik nad vrednostjo PCx in ena tik pod njo. Kadar imata podatkovni točki, ki ležita tik nad vrednostjo PCx in pod njo, koordinate (a, b) oziroma (c, d), se lahko vrednost PCx izračuna z uporabo naslednje enačbe:

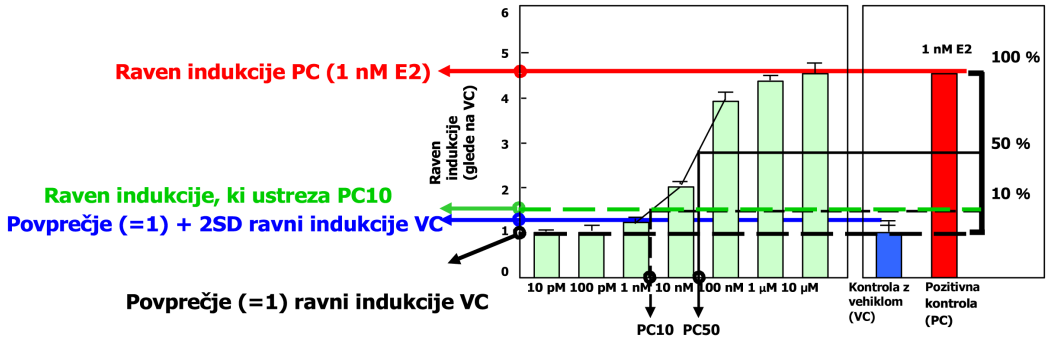
$$\log[PCx] = \log[c] + (x - d)/(d - b)$$

▼M8

38. Opisi vrednosti PC so navedeni na sliki 1 v nadaljevanju.

Slika 1

Primer izpeljave vrednosti PC. PC (1 nM E2) je vključena na vsako preskusno ploščo.



Preskus z antagonistom ER

39. V primeru preskusa z antagonistom ER, katerega cilj je dobiti relativno transkripcijsko aktivnost (RTA) za eksogeno sintetično kontrolo (*spike in*) (25 pM E2), se lahko luminiscenčni signali z iste plošče analizirajo v korakih, opisanih v nadaljevanju (sprejemljivi so tudi drugi enakovredni matematični postopki).

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom.

2. korak Od vrednosti za posamezno jamico odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom, da normalizirate podatke.

3. korak Izračunajte srednjo vrednost za normalizirano eksogeno sintetično kontrolo (*spike in*).

4. korak Normalizirano vrednost vsake jamice na plošči delite s srednjo vrednostjo normalizirane eksogene sintetične kontrole (*spike in*) (eksogena sintetična kontrola = 100 %).

Končna vrednost vsake jamice je relativna transkripcijska aktivnost za zadevno jamico glede na odziv eksogene sintetične kontrole (*spike in*).

5. korak Za vsako tretiranje izračunajte srednjo vrednost relativne transkripcijske aktivnosti.

Preudarki v zvezi z indukcijo IC_{30} in IC_{50}

40. Za pozitivne kemikalije je treba zagotoviti koncentracije, ki povzročijo IC30, in če je ustrezno, IC50.

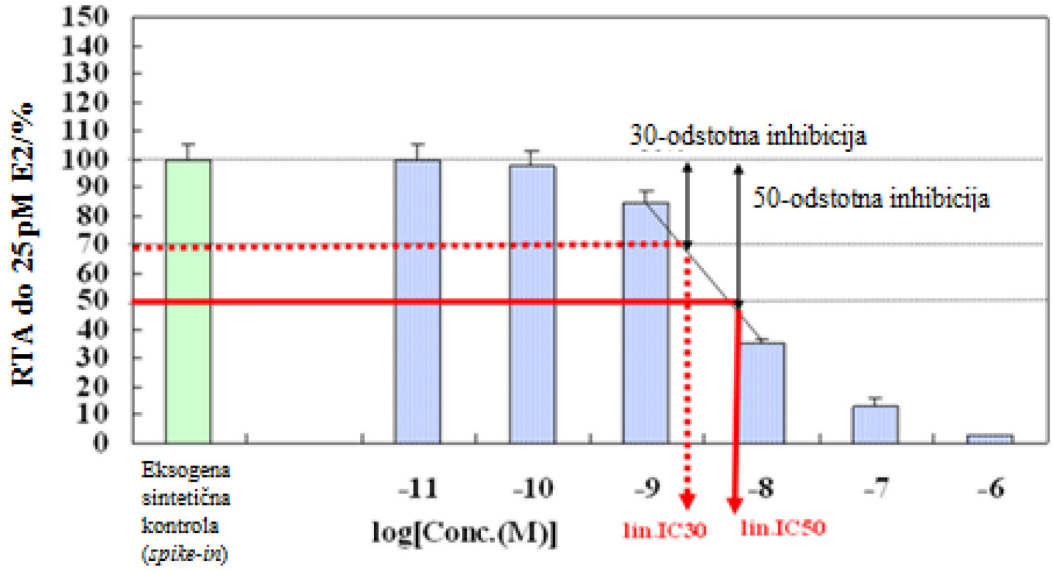
41. Vrednost ICx se lahko izračuna z interpolacijo med dvema točkama na koordinati X-Y, pri čemer je ena tik nad vrednostjo ICx in ena tik pod njo. Kadar imata podatkovni točki, ki ležita tik nad vrednostjo ICx in pod njo, koordinate (c, d) oziroma (a, b), se lahko vrednost ICx izračuna z uporabo naslednje enačbe:

$$\text{lin ICx} = a - (b - (100 - x))\,(a - c)/(b - d)$$

▼M8

Slika 2

Primer izpeljave vrednosti IC. Eksogena sintetična kontrola (*spike in*) (25 pM E2) je vključena na vsako preskusno ploščo.



RTA: relativna transkripcijska aktivnost.

42. Rezultati morajo temeljiti na dveh (ali treh) neodvisnih ponovitvah. Če se z dvema ponovitvama dobijo primerljivi in torej obnovljivi rezultati, tretje ponovitve ni treba izvesti. Rezultati so sprejemljivi, če:

— izpolnjujejo merila za sprejemljivost (glej merila za sprejemljivost v odstavkih 14–20),

— so obnovljivi.

Merila za razlago rezultatov

Preglednica 7

Merila za odločitev, ali je pri preskusu z agonistom ER snov pozitivna ali negativna

Pozitivna	Če je dobljena vrednost RPC_{Max} najmanj enaka 10 % odziva pozitivne kontrole pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
Negativna	Če vrednost RPC_{Max} ne doseže vsaj 10 % odziva pozitivne kontrole pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

Preglednica 8

Merila za negativno in pozitivno odločitev pri preskusu z antagonistom ER

Pozitivna	Če je vrednost IC30 izračunana pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
Negativna	Če vrednost IC30 ni izračunana pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

▼M8

43. Merila za razlago podatkov so prikazana v preglednicah 7 in 8. Za pozitivne rezultate sta značilni velikost učinka in koncentracija, pri kateri se pojavi učinek. Oba ta cilja sta dosežena, če so rezultati izraženi kot koncentracija, pri kateri sta vrednosti PC 50 % (PC50) ali 10 % (PC10) doseženi pri preskusu z agonistom, vrednost 50 % (IC50) ali 30 % (IC30) eksogene sintetične kontrole (*spike-in*) pa je pri preskusu z antagonistom zavrta. Preskusna kemikalija je sicer določena kot pozitivna, če je največji odziv, ki ga sproži preskusna kemikalija (RPCMax), najmanj enak 10 % odziva PC pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev, medtem ko se preskusna kemikalija šteje za negativno, če RPCMax ne doseže vsaj 10 % odziva pozitivne kontrole pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

44. Za izračune PC10, PC50 in PCMax pri preskusu z agonistom ER ter IC30 in IC50 pri preskusu z antagonistom ER se lahko uporabi preglednica, ki je skupaj s smernico za preskušanje na voljo na javnem spletnem mestu OECD ([1]).

45. Zadostovati bi moralo, da se vrednosti PC10 ali PC50 in IC30 ali IC50 dobijo vsaj dvakrat. Če pa tako dobljena referenčna vrednost za podatke v istem območju koncentracije kaže variabilnost z nedopustno visokim koeficientom variacije (KV; %), podatkov ni mogoče šteti za zanesljive in je treba opredeliti izvor tako visoke variabilnosti. KV neobdelanih podatkov treh ponovitev (tj. podatkov o intenzivnosti luminescence) za podatkovne točke, ki se uporabijo za izračun PC10 , mora biti manjši od 20 %.

46. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost kaže, da preskusni sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljše zagotovilo, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitev rezultatov prve ponovitve.

47. V primeru preskusa z agonistom ER, če je poleg te smernice za preskušanje za namene presejanja in prednostnega razvrščanja za pozitivne preskusne kemikalije potrebnih še več informacij, zlasti za kemikalije PC10–PC49 in kemikalije, za katere se sumi, da pretirano spodbujajo luciferazo, se lahko z uporabo antagonista ERα potrdi, da gre pri opaženi luciferazni aktivnosti izključno za odziv, povezan z ERα (glej Dodatek 2.1).

POROČILO O PRESKUSU

48. Glej odstavek 20 „ELEMENTI PRESKUSA TA ER“.

VIRI

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 225), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459–1469.

(3) Kuiper, G. G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252–4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen, M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89–94.

(5) Kobayashi, H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769–71.

(6) Dussurget, O., in Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953–9.

(7) De Lean, A., Munson, P. J., in Rodbard, D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼M8

Dodatek 2.1

LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: OCENA NERECEPTORSKO POVZROČENIH LUMINISCENČNIH SIGNALOV

1. Lažno pozitivne rezultate pri preskusu z agonistom ER lahko povzroči aktivacija luciferaznega gena, ki ni povzročena z ER, ali neposredna aktivacija genskega produkta ali nepovezane fluorescence. Na take učinke kaže nepopolna ali neobičajna krivulja odziva na odmerek. Če se sumi o obstoju takih učinkov, je treba preučiti učinek antagonista ER (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri netoksični koncentraciji) na odziv. Čisti antagonist ICI 1827 80 morda ni primeren za ta namen, saj se lahko zaradi zadostne koncentracije ICI 1827 80 zniža vrednost kontrole z vehiklom, kar vpliva na podatkovno analizo.

2. Za zagotovitev veljavnosti tega pristopa je treba na isti plošči preskusiti naslednje:

   — agonistično delovanje neznane kemikalije z/brez 10 μM OHT,

   — kontrolo z vehiklom (v treh ponovitvah),

   — OHT (v treh ponovitvah),

   — 1 nM E2 (v treh ponovitvah) kot agonist pozitivne kontrole,

   — 1 nM E2 + OHT (v treh ponovitvah).

Merila za razlago rezultatov

Opomba: vse jamice je treba tretirati z enako koncentracijo vehikla.

— Če na agonistično delovanje neznane kemikalije tretiranje z antagonistom ER NE vpliva, je razvrščena kot „negativna“.

— Če je agonistično delovanje neznane kemikalije popolnoma zavrto, uporabite merila za sprejetje odločitve.

— Če je agonistično delovanje pri najnižji koncentraciji najmanj enako odzivu PC10 , je inhibicija neznane kemikalije najmanj enaka odzivu PC10. Izračuna se razlika v odzivih med netretiranimi in tretiranimi jamicami z antagonistom ER, to razliko pa je treba šteti za dejanski odziv in jo je treba uporabiti za izračun ustreznih parametrov, da se lahko sprejme odločitev o razvrstitvi.

Podatkovna analiza

Preverite standard izvajanja.

Preverite KV med jamicami, tretiranimi v enakih pogojih.

1. Izračunajte srednjo vrednost kontrole z vehiklom.

2. Srednjo vrednost kontrole z vehiklom odštejte od vrednosti za posamezno jamico, ki **ni** tretirana z OHT.

3. Izračunajte srednjo vrednost OHT.

4. Od vrednosti za posamezno jamico, tretirano z OHT, odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom.

5. Izračunajte srednjo vrednost pozitivne kontrole.

6. Izračunajte relativno transkripcijsko aktivnost vseh drugih jamic glede na pozitivno kontrolo.

▼M8

Dodatek 2.2

PRIPRAVA SERUMA, TRETIRANEGA Z OGLJEM, PREVLEČENIM Z DEKSTRANOM (DCC)

1. Tretiranje seruma z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC), je splošna metoda za odstranitev estrogenih spojin iz seruma, ki se doda celičnemu gojišču, da se izključi izkrivljen odziv, povezan z ostanki estrogenov v serumu. S tem postopkom se lahko tretira 500 ml fetusnega seruma goveda (FBS).

Elementi

2. Potrebni so materiali in oprema, navedeni v nadaljevanju.

Materiali

Aktivno oglje

Dekstran

Magnezijev klorid heksahidrat (MgCl2 · 6 H2O)

Saharoza

1 M pufrske raztopine HEPES (pH 7,4)

Ultra čista voda, dobljena s filtrskim sistemom

Oprema

Avtoklavirana steklena posoda (velikost je treba ustrezno prilagoditi), običajna laboratorijska centrifuga (pri kateri se lahko temperatura nastavi na 4 °C)

Postopek

3. Naslednji postopek je prilagojen za uporabo 50-mililitrskih centrifugalnih epruvet.

[1. dan] Pripravite raztopino oglja, prevlečenega z dekstranom, z 1 l ultra čiste vode, ki vsebuje 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M saharoze, 2,5 g oglja, 0,25 g dekstrana in 5 mM HEPES, ter jo čez noč mešajte pri 4 °C.

[2. dan] Raztopino odmerite v 50-mililitrske centrifugalne epruvete in 10 minut centrifugirajte pri 10 000 vrt./min pri 4 °C. Odstranite supernatant in polovico usedline oglja shranite pri 4 °C, da se bo uporabila tretji dan. Drugo polovico oglja raztopite s FBS, ki ste ga odtaljevali počasi, da se je preprečilo obarjanje, in 30 minut toplotno inaktivirali pri 56 °C, nato vse skupaj prestavite v avtoklavirano stekleno posodo, kot je erlenmajerica. To suspenzijo čez noč rahlo mešajte pri 4 °C.

[3. dan] Odmerite suspenzijo s FBS v centrifugalne epruvete za 10-minutno centrifugiranje pri 10 000 vrt./min pri 4 °C. Zberite FBS in ga prenesite na novo ogleno usedlino, pripravljeno in shranjeno drugi dan. Suspendirajte ogleno usedlino in to suspenzijo čez noč rahlo mešajte v avtoklavirani stekleni posodi pri 4 °C.

[4. dan] Odmerite suspenzijo za 10-minutno centrifugiranje pri 10 000 vrt./min. pri 4 °C in sterilizirajte supernatant s filtracijo skozi 0,2-mikrometrski sterilni filter. Ta FBS, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC), je treba hraniti pri -20 °C in porabiti v enem letu.

▼**M8**

Dodatek 3

PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKEGA RECEPTORJA VM7LUC ZA OPREDELITEV AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem preskusu se uporablja celična linija VM7Luc4E2 ([1]). Validirala sta jo National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) in Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Celične linije VM7Luc pretežno izražajo endogeno ERα in manjšo količino endogene ERβ (2) (3) (4).

2. Ta preskus se uporablja za širok razpon snovi, če jih je mogoče raztopiti v dimetil sulfoksidu (DMSO; CASRN 67-68-5), ne reagirajo z DMSO ali gojiščem celičnih kultur in niso toksične pri koncentracijah, ki se preskušajo. Če uporaba DMSO ni mogoča, se lahko uporabi drug vehikel, kot je etanol ali voda (glej odstavek 12). Dokazana učinkovitost preskusa z (ant)agonistom VM7Luc ER TA nakazuje, da se lahko podatki, dobljeni s tem preskusom, uporabijo za z ER povzročene mehanizme delovanja in se lahko upoštevajo pri prednostnem razvrščanju snovi za nadaljnje preskušanje.

3. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hERα in hERß povzročene TA z merjenjem kemiluminiscence kot končne točke. Uporaba kemiluminiscence v bioloških preskusih je zelo razširjena, ker ima luminiscenca visoko razmerje med signalom in ozadjem. Vendar lahko aktivnost kresničkine luciferaze v celičnih preskusih motijo snovi, ki zavirajo luciferazni encim, kar povzroči bodisi očitno zaviranje bodisi povečano luminiscenco zaradi stabilizacije proteinov. Poleg tega se je pri nekaterih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu ER poročalo o nereceptorsko povzročenih luminiscenčnih signalih pri koncentracijah fitoestrogena, višjih od 1 μM, ki so se pojavili zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena (9) (11). Čeprav krivulja odziva na odmerek kaže, da do dejanske aktivacije sistema ER pride pri nižjih koncentracijah, je treba izražanje luciferaze, dobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti v sistemih preskusa ER TA s stabilno transfekcijo.

4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka „SPLOŠNI UVOD“ in „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

([1]) Pred junijem 2016 se je ta celična linija imenovala BG1Luc. Celice BG-1 so prvotno opisali Geisinger *et al.* (1998) (12), pozneje pa so njihove lastnosti določili raziskovalci inštituta National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Še ne tako daleč nazaj so odkrili, da obstajata dve varianti celic BG-1, ki ju uporabljajo raziskovalci, tj. BG-1 Fr in BG-1 NIEHS. Poglobljena analiza, vključno s testiranjem DNK, teh dveh variant celične linije BG-1, ki so jo izvedli Li in sodelavci (2014) (14), je pokazala, da je BG-1 Fr edinstvena in da BG-1 NIEHS, tj. prvotna celična linija, ki je bila uporabljena za razvoj preskusa, ni celična linija karcinoma jajčnikov pri človeku, tj. BG1, temveč je varianta celične linije raka dojke pri človeku, tj. MCF7. Celična linija, uporabljena v preskusu, ki se je prvotno imenovala BG1Luc4E2 (15), se bo zdaj imenovala VM7Luc4E2 („V“ = varianta; „M7“ = celice MCF7). Podobno se bo tudi preskus zdaj imenoval VM7Luc ER TA. Čeprav se s tem spremeni izvor celične linije, na kateri temelji preskus, to ne vpliva na objavljene validacijske študije niti na koristnost in uporabo tega preskusa za presejanje estrogenskih/antiestrogenskih kemikalij.

▼M8

NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. S tem preskusom se pokaže vezava liganda ER, ki ji sledi premestitev kompleksa receptor-ligand na jedro. V jedru se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira poročevalski gen (*luc*), kar povzroči nastanek luciferaze in poznejše oddajanje svetlobe, kar je mogoče kvantificirati z luminometrom. Luciferazno aktivnost je mogoče hitro in poceni oceniti s številnimi kompleti, ki so na voljo na trgu. Pri VM7Luc ER TA se uporablja celična linija človeškega adenokarcinoma, odzivna na ER, tj. VM7, ki je bila stabilno transfecirana s konstruktom kresničkinega poročevalskega gena *luc* pod nadzorom štirih odzivnih elementov za estrogen nad promotorjem virusa tumorja mlečne žleze pri miši (MMTV) za zaznavo snovi z agonističnim ali antagonističnim delovanjem ER *in vitro*. Ta promotor MMTV le šibko navzkrižno reagira z drugimi steroidnimi in nesteroidnimi hormoni (8). Merila za razlago podatkov so podrobno opisana v odstavku 41. Na kratko, pozitiven odziv se opredeli s krivuljo odziva na koncentracijo, ki vsebuje vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo (srednja vrednost ± standardni odklon), in s spremembo amplitude (normalizirana relativna svetlobna enota (RLU)), ki znaša vsaj 20 % največje vrednosti za referenčni standard (17β-estradiol (E2; CASRN 50-28-2) za preskus z agonistom, raloksifen HCl (Ral; CASRN 84449-90-1)/E2 za preskus z antagonistom).

POSTOPEK

Celična linija

6. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo VM7Luc4E2. Celična linija je trenutno na voljo samo s tehničnim licenčnim sporazumom z univerzo University of California, Davis, Kalifornija, ZDA ([1]), in podjetjem Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Severna Karolina, ZDA ([2]).

Stabilnost celične linije

7. Da se ohranita stabilnost in celovitost celične linije, je treba celice iz zamrznjene zaloge v vzdrževalnem gojišču gojiti več kot eno pasažo (glej odstavek 9). Celice se ne smejo gojiti več kot 30 pasaž. Za celično linijo VM7Luc4E2 30 pasaž pomeni približno tri mesece.

Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na plošče

8. Slediti je treba postopkom iz smernic za dobro prakso pri gojenju celic (5) (6), da se zagotovi kakovost vseh materialov in metod ter tako ohranijo celovitost, veljavnost in obnovljivost vsega opravljenega dela.

9. Celice VM7Luc4E2 se vzdržujejo v gojišču RPMI 1640 z dodanima 0,9-odstotno raztopino Pen-Strep in 8,0-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS) v namenskem inkubatorju za tkivne kulture pri 37 ± 1 °C, vlažnosti, ki znaša 90 ± 5 %, in 5,0 ± 1 % CO_2 v zraku.

10. Ko je dosežena ~ 80-odstotna konfluenca, se celice VM7Luc4E2 kultivirajo na novem gojišču in 48 ur kondicionirajo v okolju brez estrogena, preden se nasadijo na 96-jamične plošče, da se izpostavijo preskusnim kemikalijam in

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. profesor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-naslov: msdenison@ucdavis.edu, (530) 7548649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-naslov: info@dioxins.com, telefon: 9196884804, telefaks: 9196884404.

▼M8

analizi indukcije luciferazne aktivnosti v odvisnosti od estrogena. Gojišče brez estrogena (EFM) vsebuje Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče (DMEM) brez fenol rdečega, ki so mu dodani 4,5-odstotni FBS, tretiran z ogljem/dekstranom, 1,9-odstotni L-glutamin in 0,9-odstotna raztopina Pen-Strep. V plastičnih posodah ne sme biti estrogenskega delovanja (glej podroben protokol (7)).

Merila za sprejemljivost

11. Sprejetje ali zavrnitev preskusa temelji na oceni rezultatov referenčnih standardov in kontrol za posamezni poskus, izveden na 96-jamični plošči. Vsak referenčni standard se preskusi pri več koncentracijah, prav tako je več vzorcev vsake referenčne in kontrolne koncentracije. Rezultati se primerjajo s kontrolami kakovosti za te parametre, izpeljanimi iz zbirk podatkov iz preteklih preskusov z agonisti in antagonisti, ki jih je vsak laboratorij ustvaril med dokazovanjem usposobljenosti. Zbirke podatkov iz preteklih preskusov se stalno posodabljajo z vrednostmi referenčnih standardov in kontrol. Zaradi sprememb opreme ali laboratorijskih pogojev je morda treba ustvariti posodobljene zbirke podatkov iz preteklih preskusov.

Preskus z agonistom

Preskus za določanje območja

- Indukcija: indukcijo plošče je treba izmeriti tako, da se povprečna najvišja vrednost relativne svetlobne enote (RLU) za referenčni standard E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO. Običajno je doseženo petkratno razmerje indukcije, vendar mora biti za namene sprejemljivosti razmerje indukcije najmanj štirikratno.

- Rezultati kontrole z DMSO: vrednosti RLU za kontrolo s topilom morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo s topilom iz preteklih preskusov.

- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Celovit preskus

Vključuje merila za sprejemljivost iz preskusa za določanje območja z agonistom in naslednje:

- rezultate referenčnih standardov: krivulja odziva na koncentracijo za referenčni standard E2 mora imeti sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega dela krivulje odziva na koncentracijo.

- rezultate pozitivne kontrole: vrednosti RLU za kontrolo z metoksiklorom morajo biti višje od srednje vrednosti za DMSO, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona od srednje vrednosti za DMSO.

- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Preskus z antagonistom

Preskus za določanje območja

- Redukcija: redukcijo plošče se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard Ral/E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO. Običajno je doseženo petkratno razmerje redukcije, vendar mora biti za namene sprejemljivosti razmerje redukcije najmanj trikratno.

- Rezultati kontrole z E2: vrednosti RLU za kontrolo z E2 morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo z E2 iz preteklih preskusov.

▼M8

- Rezultati kontrole z DMSO: vrednosti RLU za kontrolo z DMSO morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo s topilom iz preteklih preskusov.

- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Celovit preskus

Vključuje merila za sprejemljivost iz preskusa za določanje območja z antagonistom in naslednje:

- rezultate referenčnih standardov: krivulja odziva na koncentracijo za referenčni standard Ral/E2 mora imeti sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega dela krivulje odziva na koncentracijo;

- rezultate pozitivne kontrole: vrednosti RLU za kontrolo s tamoksifenom/E2 morajo biti nižje od srednje vrednosti za kontrolo z E2, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona od srednje vrednosti za kontrolo z E2.

- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Referenčni standardi, pozitivna kontrola in kontrola z vehiklom

Kontrola z vehiklom (preskusi z agonistom in antagonistom)

12. Vehikel, v katerem se raztopi preskusna kemikalija, je treba preskusiti kot kontrolo z vehiklom. Vehikel, ki je bil uporabljen med validacijo preskusa VM7Luc ER TA, je bil 1 vol. % dimetilsulfoksida (DMSO, CASRN 67-68-5) (glej odstavek 24). Če se uporabi drug vehikel, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu, če je ustrezno.

Referenčni standard (določanje območja z agonistom)

13. Referenčni standard je E2 (CASRN 50-28-2). Pri preskušanju za določanje območja referenčni standard sestavlja zaporedno redčenje štirih koncentracij E2 (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} in 2,87 x 10^{-12} M), pri čemer se vsaka koncentracija preskusi v po dveh jamicah.

Referenčni standard (celovit preskus z agonistom)

14. E2 za celovito preskušanje sestavlja zaporedno redčenje v razmerju 1: 2, ki vključuje 11 koncentracij (od 3,67 x 10^{-10} do 3,59 x 10^{-13} M) E2 v po dveh jamicah.

Referenčni standard (določanje območja z antagonistom)

15. Referenčni standard je kombinacija Ral (CASRN 84449-90-1) in E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pri preskušanju za določanje območja obsega zaporedno redčenje treh koncentracij Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} in 1,92 x 10^{-10} M) in fiksno koncentracijo (9,18 × 10^{-11} M) E2 v po dveh jamicah.

Referenčni standard (celovit preskus z antagonistom)

16. Ral/E2 za celovito preskušanje obsega zaporedno redčenje Ral v razmerju 1: 2 (od 2,45 x 10^{-8} do 9,57 x 10^{-11} M) in fiksno koncentracijo (9,18 × 10^{-11} M) E2, ki jo sestavlja devet koncentracij Ral/E2 v po dveh jamicah.

Šibka pozitivna kontrola (z agonistom)

17. Šibka pozitivna kontrola je 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoksiklora (metoksiklor; CASRN 72-43-5) v EFM.

▼M8

Šibka pozitivna kontrola (z antagonistom)

18. Šibko pozitivno kontrolo sestavlja tamoksifen (CASRN 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M z 9,18 × 10^{-11} M E2 v EFM.

Kontrola z E2 (samo preskus z antagonistom)

19. Kontrola z E2 je 9,18 × 10^{-11} M E2 v EFM in se uporablja kot osnovna negativna kontrola.

Razmerje indukcije (z agonistom)

20. Indukcija luciferazne aktivnosti referenčnega standarda (E2) se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO, pri čemer mora biti rezultat večji od štirikratnega razmerja.

Razmerje redukcije (z antagonistom)

21. Srednja luciferazna aktivnost referenčnega standarda (Ral/E2) se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard Ral/E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO in mora biti večja od trikratnega razmerja.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“ te preskusne metode)

Vehikel

22. Preskusne kemikalije je treba raztopiti v topilu, v katerem je topna zadevna preskusna kemikalija in ki se meša s celičnim gojiščem. Primerni vehikli so voda, etanol (od 95- do 100-odstotna čistost) in DMSO. Če se uporabi DMSO, raven ne sme preseči 1 vol. %. Za vsak vehikel je treba dokazati, da največja uporabljena količina ni citotoksična in ne moti učinkovitosti preskusa. Referenčni standardi in kontrole se raztopijo v 100-odstotnem topilu in nato razredčijo na ustrezne koncentracije v EFM.

Priprava preskusnih kemikalij

23. Preskusne kemikalije se raztopijo v 100-odstotnem DMSO (ali ustreznem topilu) in nato razredčijo na ustrezne koncentracije v EFM. Vse preskusne kemikalije je treba pustiti, da se uravnotežijo na sobno temperaturo, preden se raztopijo in razredčijo. Za vsak preskus je treba pripraviti sveže raztopine preskusnih kemikalij. Raztopine ne smejo imeti vidne oborine ali motnosti. Zaloge referenčnih standardov in kontrol se lahko pripravijo v večjih količinah; vendar je treba za vsak poskus pripraviti sveže končne referenčne standarde, kontrolne razredčine in preskusne kemikalije ter jih porabiti v 24 urah po pripravi.

Topnost in citotoksičnost: preudarki glede določanja območja

24. Preskušanje za določanje območja sestavljajo sedemtočkovne zaporedne razredčine v razmerju 1: 10, izvedene v dveh ponovitvah. Preskusne kemikalije se najprej preskusijo do največje koncentracije 1 mg/ml (~ 1 mM) za preskušanje z agonistom in 20 μg/ml (~ 10 μM) za preskušanje z antagonistom. S poskusi za določanje območja se določi naslednje:

— začetne koncentracije preskusnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti pri celovitem preskušanju;

— razredčine preskusnih kemikalij (1: 2 ali 1: 5), ki jih je treba uporabiti pri celovitem preskušanju.

▼M8

25. Ocena viabilnosti/citotoksičnosti celic je vključena v protokole preskusov z agonistom in antagonistom (7) ter je del preskušanja za določanje območja in celovitega preskušanja. Metoda citotoksičnosti, ki je bila uporabljena za oceno viabilnosti celic med validacijo VM7Luc ER TA (1), je bila postopna kvalitativna metoda vizualnega opazovanja; uporabi pa se lahko tudi kvantitativna metoda za ugotavljanje citotoksičnosti (glej protokol (7)). Podatkov iz koncentracij preskusnih kemikalij, ki povzročijo več kot 20-odstotno zmanjšanje viabilnosti, ni mogoče uporabiti.

Izpostavitev preskusni kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči

26. Celice se preštejejo in nasadijo na 96-jamične plošče s tkivno kulturo (2×10^5 celic na jamico) v EFM ter 24 ur inkubirajo, da se lahko celice pritrdijo na ploščo. EFM se odstrani, nadomesti s preskusno in referenčno kemikalijo v EFM ter 19–24 ur inkubira. Posebni preudarki so potrebni pri snoveh, ki so zelo hlapne, saj lahko kontrolne jamice v bližini povzročijo lažno pozitivne rezultate. V takih primerih je mogoče s „tesnili“ za plošče med preskušanjem učinkovito izolirati posamezne jamice, zato je njihova uporaba priporočljiva.

Preskusi za določanje območja

27. Pri preskušanju za določanje območja se uporabijo vse jamice na 96-jamični plošči, da se preskusi do šest preskusnih kemikalij, in sicer kot sedemtočkovne zaporedne razredčine v razmerju 1: 10 v dveh ponovitvah (glej sliki 1 in 2).

— Pri preskušanju za določanje območja z *agonistom* se uporabijo štiri koncentracije E2 v dveh ponovitvah kot referenčni standard in štiri jamice s ponovljenimi vzorci za kontrolo z DMSO.

— Pri preskušanju za določanje območja z *antagonistom* se uporabijo tri koncentracije Ral/E2 z $9{,}18 \times 10^{-11}$ M v dveh ponovitvah kot referenčni standard in tri jamice s ponovljenimi vzorci za kontrole z E2 in DMSO.

Slika 1

Razporeditev na 96-jamični plošči pri preskusu za določanje območja z agonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Kratice: od E2-1 do E2-4 = koncentracije referenčnega standarda E2 (od visoke do nizke); od TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); od TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 3 (TC3); od TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 4 (TC4); od TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 5 (TC5); od TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

▼M8

Slika 2

Razporeditev na 96-jamični plošči pri preskusu za določanje območja z antagonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Kratice: E2 = kontrola z E2; od Ral-1 do Ral-3 = koncentracije referenčnega standarda raloksifena/E2 (od visoke do nizke); od TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); od TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 3 (TC3); od TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 4 (TC4); od TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 5 (TC5); od TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

Opomba: vse preskusne kemikalije se preskusijo v prisotnosti $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Priporočena končna količina gojišča, potrebna za vsako jamico, je 200 µl. Uporabljajte samo preskusne plošče, pri katerih je viabilnost celic v vseh jamicah vsaj 80-odstotna.

29. Določitev začetnih koncentracij za celovito preskušanje z ***agonistom*** je podrobno opisana v protokolu za preskus z agonistom (7). Na kratko, uporabijo se naslednja merila:

— če na krivulji koncentracije preskusne kemikalije ni točk nad srednjo vrednostjo, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona kontrole z DMSO, se celovito preskušanje izvede z 11-točkovnim zaporednim redčenjem v razmerju 1: 2, ki se začne pri najvišji topni koncentraciji;

— če so na krivulji koncentracije preskusne kemikalije točke nad srednjo vrednostjo, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona kontrole z DMSO, mora biti začetna koncentracija, ki se uporabi za 11-točkovno shemo redčenja pri celovitem preskušanju, za en logaritem višja od koncentracije, pri kateri se dobi najvišja prilagojena vrednost RLU pri določanju območja. 11-točkovna shema redčenja temelji na razredčinah v razmerju 1: 2 ali 1: 5 v skladu z naslednjimi merili:

11-točkovno zaporedno redčenje v razmerju 1: 2 je treba uporabiti, če dobljeno območje koncentracije zajema celoten razpon odzivov na podlagi krivulje odziva na koncentracijo, dobljene pri preskusu za določanje območja. V nasprotnem primeru uporabite redčenje v razmerju 1: 5;

▼M8

— če ima preskusna kemikalija bifazno krivuljo odziva na koncentracijo pri preskusu za določanje območja, je treba obe fazi obravnavati tudi pri celovitem preskušanju.

30. Določitev začetnih koncentracij za celovito preskušanje z ***antagonistom*** je podrobno opisana v protokolu za preskus z antagonistom (7). Na kratko, uporabijo se naslednja merila:

— če na krivulji koncentracije preskusne kemikalije ni točk pod srednjo vrednostjo, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona kontrole z E2, se celovito preskušanje s kontrolo izvede z 11-točkovnim zaporednim redčenjem v razmerju 1: 2, ki se začne pri najvišji topni koncentraciji;

— če so na krivulji koncentracije preskusne kemikalije točke pod srednjo vrednostjo, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona kontrole z E2, mora biti začetna koncentracija, ki se uporabi za 11-točkovno shemo redčenja pri celovitem preskušanju, ena od naslednjih:

• koncentracija, s katero se dobi najnižja prilagojena vrednost RLU pri določanju območja;

• najvišja topna koncentracija (glej protokol za preskus z antagonistom (7), slika 14-2);

• najnižja citotoksična koncentracija (za podoben primer glej protokol za preskus z antagonistom (7), slika 14-3);

— 11-točkovna shema redčenja temelji na zaporednem redčenju v razmerju 1: 2 ali 1: 5 v skladu z naslednjimi merili:

11-točkovno zaporedno redčenje v razmerju 1: 2 je treba uporabiti, če dobljeno območje koncentracije zajema celoten razpon odzivov na podlagi krivulje odziva na koncentracijo, dobljene pri preskusu za določanje območja. V nasprotnem primeru je treba uporabiti redčenje v razmerju 1: 5.

Celoviti preskusi

31. Celovito preskušanje sestavljajo 11-točkovne zaporedne razredčitve (zaporedne razredčine v razmerju 1: 2 ali 1: 5, odvisno od začetne koncentracije pri merilih za celovito preskušanje), pri čemer se vsaka koncentracija preskusi v treh jamicah na 96-jamični plošči (glej sliki 3 in 4).

— Pri preskušanju z *agonistom* se kot referenčni standard uporabi 11 koncentracij E2 v dveh ponovitvah. Na vsako ploščo se vključijo štiri jamice s ponovljenim vzorcem za kontrolo z DMSO in štiri jamice s ponovljenim vzorcem za kontrolo z metoksiklorom (9,06 x 10^{-6} M).

— Pri celovitem preskušanju z *antagonistom* se kot referenčni standard uporabi devet koncentracij Ral/E2 z 9,18 × 10^{-11} M E2 v dveh ponovitvah skupaj s štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za kontrolo z E2 9,18 x 10^{-11} M, štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za kontrole z DMSO in štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za tamoksifen 3,36 x 10^{-6} M.

▼M8

Slika 3

Razporeditev na 96-jamični plošči pri celovitem preskusu z agonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Kratice: od TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1; od TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2; od E2-1 do E2-11 = koncentracije referenčnega standarda E2 (od visoke do nizke); met = šibka pozitivna kontrola s p,p' metoksiklorom; VC = kontrola z vehiklom DMSO (1 vol. %) EFM.

Slika 4

Razporeditev na 96-jamični plošči pri celovitem preskusu z antagonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Kratice: E2 = kontrola z E2; od Ral-1 do Ral-9 = koncentracije referenčnega standarda raloksifena/E2 (od visoke do nizke); tam = šibka pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; od TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).Opomba: kot je bilo navedeno, vse referenčne in preskusne jamice vsebujejo fiksno koncentracijo E2 (9,18 x 10^{-11} M).

32. Ponovljene celovite preskuse za isto kemikalijo je treba izvesti na različne dneve, da se zagotovi neodvisnost. Izvesti je treba vsaj dva celovita preskusa. Če si rezultati preskusov nasprotujejo (npr. en preskus je pozitiven, drugi negativen) ali če je eden od preskusov neustrezen, je treba izvesti dodatni tretji preskus.

Merjenje luminiscence

33. Luminiscenca se meri v razponu od 300 do 650 nm z uporabo luminometra za injiciranje in programske opreme, s katero se uravnavata injekcijski volumen in interval merjenja (7). Oddajanje svetlobe iz vsake jamice se izrazi kot RLU na jamico.

▼M8

ANALIZA PODATKOV

Določanje EC_{50}/IC_{50}

34. Vrednosti EC_{50} (srednja efektivna koncentracija preskusne snovi (agonisti)) in IC_{50} (srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi (antagonisti)) se določita na podlagi podatkov o odzivu na koncentracijo. Za preskusne kemikalije, ki so pozitivne pri eni ali več koncentracijah, se koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči srednji odziv (IC_{50} ali EC_{50}), izračuna z analizo Hillove funkcije ali ustrezno alternativo. Hillova funkcija je štiriparametrski logistični matematični model, pri katerem se koncentracija preskusne kemikalije poveže z odzivom (običajno s sigmoidno krivuljo), tako da se uporabi spodnja enačba:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hillov\ naklon}$$

pri čemer je:

Y = odziv (tj. RLU);

X = logaritem koncentracije;

dno = najmanjši odziv;

vrh = največji odziv;

lg EC_{50} (ali lg IC_{50}) = logaritem X kot odzivni razpon na sredini med vrhom in dnom;

Hillov naklon = strmina krivulje.

Z modelom se izračuna najboljše ujemanje za vrh in dno, Hillov naklon ter parametra IC_{50} in EC_{50}. Za izračun vrednosti EC_{50} in IC_{50} je treba uporabiti ustrezno statistično programsko opremo (npr. Graphpad Prism®).

Določanje osamelcev

35. Dobra statistična presoja bi se lahko olajšala z vključitvijo (med drugim) Q-testa (glej protokola za preskuse z agonistom in antagonistom (7)) za določitev „neuporabnih“ jamic, ki se izključijo iz podatkovne analize.

36. Za ponovljene vzorce referenčnega standarda E2 (velikost vzorca: dva) se vsaka prilagojena vrednost RLU za ponovljeni vzorec pri dani koncentraciji E2 šteje za osamelec, če je njegova vrednost v zbirki podatkov iz preteklih preskusov za več kot 20 % nad prilagojeno vrednostjo RLU za zadevno koncentracijo ali več kot 20 % pod njo.

Zbiranje in prilagoditev podatkov luminometra za preskušanje z določanjem položaja

37. Neobdelane podatke iz luminometra je treba prenesti na predlogo preglednice, zasnovano za preskus. Ugotoviti je treba, ali obstajajo podatkovne točke osamelcev, ki jih je treba odstraniti. (Za parametre, ki se določijo pri analizi, glej merila za sprejemljivost preskusa.) Opraviti je treba v nadaljevanju navedene izračune.

Agonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom (VC) DMSO.

2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.

▼M8

3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (E2).

4. korak Izračunajte srednjo vrednost EC_{50} za preskusne kemikalije.

Antagonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.

2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.

3. korak Izračunajte srednje razmerje indukcije za referenčni standard (Ral/E2).

4. korak Izračunajte srednjo vrednost za referenčni standard E2.

5. korak Izračunajte srednjo vrednost IC_{50} za preskusne kemikalije.

Zbiranje in prilagoditev podatkov luminometra za celovito preskušanje

38. Neobdelane podatke iz luminometra je treba prenesti na predlogo preglednice, zasnovano za preskus. Ugotoviti je treba, ali obstajajo podatkovne točke osamelcev, ki jih je treba odstraniti. (Za parametre, ki se določijo pri analizi, glej merila za sprejemljivost preskusa.) Opravijo se v nadaljevanju navedeni izračuni.

Agonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.

2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.

3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (E2).

4. korak Izračunajte srednjo vrednost EC_{50} za E2 in preskusne kemikalije.

5. korak Izračunajte prilagojeno srednjo vrednost RLU za metoksiklor.

Antagonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.

2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.

3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (Ral/E2).

4. korak Izračunajte srednjo vrednost IC_{50} za Ral/E2 in preskusne kemikalije.

5. korak Izračunajte prilagojeno srednjo vrednost RLU za tamoksifen.

6. korak Izračunajte srednjo vrednost za referenčni standard E2.

▼M8

Merila za razlago rezultatov

39. VM7Luc ER TA naj bi se uporabil v okviru pristopa, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za pomoč pri prednostnem razvrščanju snovi za preskušanje endokrinih motilcev *in vivo*. Del tega postopka prednostnega razvrščanja je razvrstitev preskusne kemikalije kot pozitivne ali negativne za delovanje agonista ali antagonista ER. Merila za pozitivno ali negativno odločitev, ki se uporabljajo v validacijski študiji VM7Luc ER TA, so opisana v preglednici 1.

Preglednica 1

Merila za pozitivno ali negativno odločitev

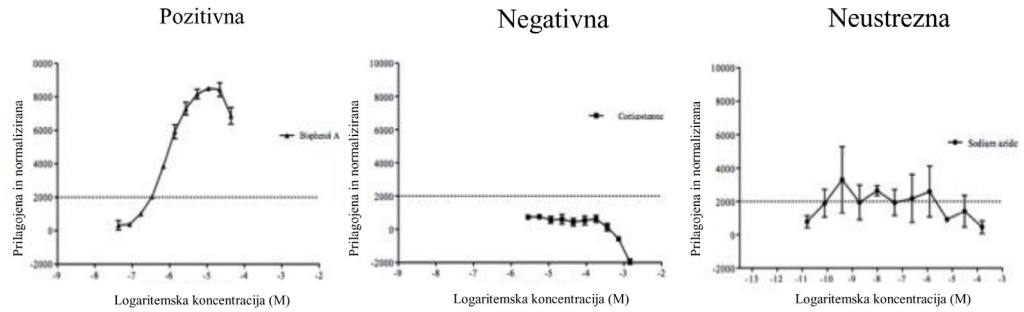
AGONISTIČNO DELOVANJE	
Pozitivna	— Vse preskusne kemikalije, ki so razvrščene kot *pozitivne za* agonistično delovanje ER, morajo imeti krivuljo odziva na koncentracijo, ki jo sestavlja bazna linija, sledi ji pozitivni naklon, konča pa se s konstantno ravnjo ali vrhom. V nekaterih primerih se lahko opredelita samo dve od teh značilnosti (bazna linija in naklon ali naklon in vrh). — Linija, ki določa pozitivni naklon, mora vsebovati vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo (srednja vrednost ± standardni odklon). Točke, ki sestavljajo bazno linijo, so izključene, lahko pa linearni del krivulje vključuje vrh ali prvo točko konstantne ravni. — Za pozitivno razvrstitev je potrebna amplituda odziva, tj. razlika med bazno linijo in vrhom, ki znaša vsaj 20 % najvišje vrednosti za referenčni standard E2 (tj. 2 000 RLU ali več, ko je najvišja vrednost odziva referenčnih standardov [E2] prilagojena na 10 000 RLU). — Če je mogoče, je treba vrednost EC_{50} izračunati za vsako pozitivno preskusno kemikalijo.
Negativna	Povprečna prilagojena RLU za dano koncentracijo je največ enaka srednji vrednosti RLU za kontrolo z DMSO, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona RLU za DMSO.
Neustrezna	Podatki, ki jih ni mogoče razlagati kot veljavne, ker kažejo bodisi prisotnost ali odsotnost delovanja zaradi večjih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev, se štejejo za neustrezne in jih ni mogoče uporabiti za določitev, ali je preskusna kemikalija pozitivna ali negativna. Kemikalije je treba znova preskusiti.
ANTAGONISTIČNO DELOVANJE	
Pozitivna	— Podatki o preskusni kemikaliji dajejo krivuljo odziva na koncentracijo, ki jo sestavlja bazna linija, tej pa sledi negativni naklon. — Linija, ki določa negativni naklon, mora vsebovati vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo; točke, ki sestavljajo bazno linijo, so izključene, lahko pa linearni del krivulje vključuje prvo točko konstantne ravni. — Delovanje se mora zmanjšati vsaj za 20 % glede na najvišjo vrednost za referenčni standard Ral/E2 (tj. 8 000 RLU ali manj, ko je najvišja vrednost odziva referenčnega standarda [Ral/E2] prilagojena na 10 000 RLU). — Najvišje necitotoksične koncentracije preskusne kemikalije lahko znašajo največ 1 x 10^{-5} M. — Če je mogoče, je treba vrednost IC_{50} izračunati za vsako pozitivno preskusno kemikalijo.
Negativna	Pri koncentracijah, nižjih od 1,0x 10^{-5} M, so vse podatkovne točke nad vrednostjo EC_{80} (80 % odziva E2 ali 8 000 RLU).
Neustrezna	Podatki, ki jih ni mogoče razlagati kot veljavne, ker kažejo bodisi prisotnost ali odsotnost delovanja zaradi večjih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev, se štejejo za neustrezne in jih ni mogoče uporabiti za določitev, ali je preskusna kemikalija pozitivna ali negativna. Kemikalijo je treba znova preskusiti.

▼**M8**

40. Za pozitivne rezultate sta značilni velikost učinka in koncentracija, pri kateri se pojavi učinek , če je mogoče. Primeri pozitivnih, negativnih in neustreznih podatkov so prikazani na slikah 5 in 6.

Slika 5

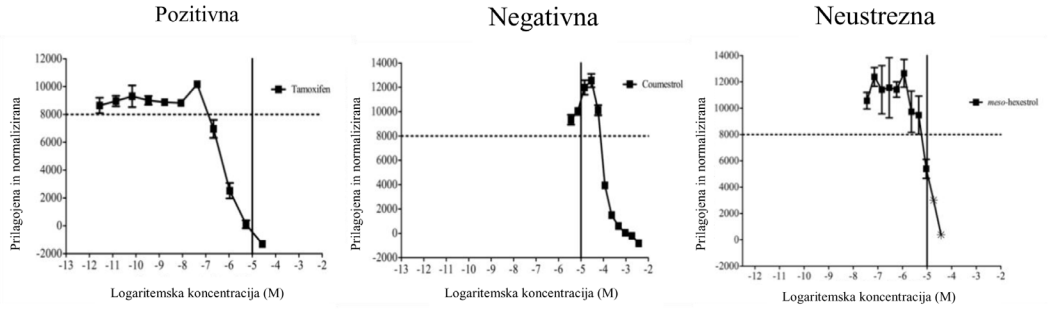
Primeri agonistov: pozitivni, negativni in neustrezni podatki



Črtkana črta ponazarja 20 % odziva E2, 2 000 prilagojenih in normaliziranih RLU.

Slika 6

Primeri antagonistov: pozitivni, negativni in neustrezni podatki



Črtkana črta ponazarja 80 % odziva Ral/E2, 8 000 prilagojenih in normaliziranih RLU.

Neprekinjena črta ponazarja 1,00 × 10^{-5} M. Da se odziv šteje za pozitiven, mora biti pod črto za 8 000 RLU in pri koncentracijah, nižjih od 1,00 × 10^{-5} M.

Koncentracije z zvezdico na grafu mezo-heksestrola ponazarjajo rezultate viabilnosti „2“ ali več.

Rezultati preskusa za mezo-heksestrol se štejejo za neustrezne podatke, ker se edini odziv, ki je pod 8 000 RLU, pojavi pri 1,00 × 10^{-5} M.

41. Izračuni EC_{50} in IC_{50} se lahko opravijo z uporabo štiriparametrske Hillove funkcije (za več podrobnosti glej protokol za preskus z agonistom in protokol za preskus z antagonistom (7)). Izpolnjevanje meril za sprejemljivost kaže, da sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljše zagotovilo, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitev rezultatov prve ponovitve (glej odstavek 19 „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“).

▼**M8**

POROČILO O PRESKUSU

42. Glej odstavek 20 „ELEMENTI PRESKUSA TA ER“.

VIRI

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls, M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23 (Suppl): str. 270–273.

(6) Coecke, S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: str. 261–287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication št. 11-7850.

(8) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1): 67–82.

(9) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10): 1459–69.

(10) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6): 646–57.

(11) Kuiper, G. G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10): 4252–63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072–2081.

(15) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67–82.

▼**M8**

Dodatek 4

PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ČLOVEŠKEGA ESTROGENSKEGA RECEPTORJA-A S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO ESTROGENSKEGA AGONISTIČNEGA IN ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA KEMIKALIJ Z UPORABO CELIČNE LINIJE ERA CALUX

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri preskusu transaktivacije ERα CALUX se človeška celična linija U2OS uporablja za zaznavo estrogenskega agonističnega in antagonističnega delovanja, povzročenega s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hERα). Validacijska študija biološkega preskusa stabilne transfekcije ERα CALUX, ki jo je opravilo podjetje BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemska), je pokazala ustreznost in zanesljivost preskusa za predvideni namen (1). Celična linija ERα CALUX izraža samo stabilno transfecirano človeško ERα (2) (3).

2. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hERα povzročene transaktivacije z merjenjem bioluminiscence kot končne točke. Bioluminiscenca se pogosto uporablja pri bioloških preskusih zaradi visokega razmerja signal/šum (4).

3. Za koncentracije fitoestrogena, višje od 1 μM, se je poročalo, da preveč aktivirajo luciferazni poročevalski gen, posledica tega pa je nereceptorsko povzročena luminiscenca (5) (6) (7). Zato je treba višje koncentracije fitoestrogenov ali drugih podobnih spojin, ki lahko preveč aktivirajo izražanje luciferaze, pri preskusih transaktivacije ER s stabilno transfekcijo skrbno preučiti (glej Dodatek 2).

4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka „SPLOŠNI UVOD“ in „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. Biološki preskus se uporablja za oceno vezave liganda ER in poznejše premestitve kompleksa receptor-ligand na jedro. V jedru se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira kresničkin luciferazni poročevalski gen, kar povzroči povečano celično izražanje luciferaznega encima. Po dodajanju luciferaznega substrata luciferina se luciferin pretvori v bioluminiscentni produkt. Proizvedeno svetlobo je mogoče zlahka zaznati in kvantificirati z luminometrom.

6. Pri preskusnem sistemu se uporabljajo stabilno transfecirane celice ERα CALUX. Celice ERα CALUX so izvirale iz celične linije človeškega osteoblastičnega osteosarkoma U2OS. Človeške celice U2OS so bile stabilno transfecirane s 3xHRE-TATA-Luc in pSG5-neo-hERα z uporabo metode koprecipitacije kalcijevega fosfata. Celična linija U2OS je bila izbrana kot najprimernejša za uporabo kot na estrogen (in drug steroidni hormon) odzivna poročevalska celična linija na podlagi opažanja, da je celična linija U2OS pokazala malo ali nič endogenega receptorskega delovanja. Neobstoj endogenih receptorjev je bil ocenjen samo z uporabo plazmidov luciferaznega poročevalskega gena, pri katerih dodajanje receptorskih ligandov ni pokazalo nikakršnega delovanja. Poleg tega je ta celična linija podprla močne s hormoni povzročene odzive, ko so bili prehodno uvedeni sorodni receptorji (2) (3) (8).

7. Preskušanje estrogenskega ali antiestrogenskega delovanja kemikalij z uporabo celične linije ERα CALUX vključuje predhodno presejalno ponovitev in celovite ponovitve. Med predhodno presejalno ponovitvijo se določijo topnost, citotoksičnost in izpopolnjeno območje koncentracije preskusnih

▼M8

kemikalij za celovito preskušanje. Med celovitimi ponovitvami se izpopolnjena območja koncentracije preskusnih kemikalij preskusijo v bioloških preskusih ERα CALUX, ki jim sledi razvrstitev preskusnih kemikalij glede na agonizem ali antagonizem.

8. Merila za razlago podatkov so podrobno opisana v odstavku 59. Na kratko, preskusna kemikalija se šteje za pozitivno za agonizem, če se pri vsaj dveh zaporednih koncentracijah preskusne kemikalije pokaže odziv, ki znaša najmanj 10 % največjega odziva referenčnega standarda 17β-estradiola (PC_{10}). Preskusna kemikalija se šteje za pozitivno za antagonizem, če se pri vsaj dveh zaporednih koncentracijah preskusne kemikalije pokaže odziv, ki znaša največ 80 % največjega odziva referenčnega standarda tamoksifena (PC_{80}).

POSTOPEK

Celične linije

9. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo U2OS ERα CALUX. S tehničnim licenčnim sporazumom jo je mogoče dobiti od podjetja BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemska.

10. Uporabijo se lahko samo celične kulture brez mikoplazme. Uporabljene serije celic morajo biti bodisi potrjeno negativne za okužbo z mikoplazmo bodisi je treba pred uporabo izvesti test za mikoplazmo. Za občutljivo zaznavo okužbe z mikoplazmo je treba uporabiti RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času) (9).

Stabilnost celične linije

11. Da se ohranita stabilnost in celovitost celic CALUX, jih je treba hraniti v tekočem dušiku (–80 °C). Po odtajanju celic za začetek gojenja nove kulture je treba celice vsaj dvakrat presaditi na novo gojišče, preden se uporabijo za oceno estrogenskega agonističnega ali antagonističnega delovanja kemikalij. Za presaditev na novo gojišče se lahko uporabi največ 30 pasaž.

12. Za spremljanje stabilnosti celične linije v daljšem časovnem obdobju je treba preveriti odzivnost sistema preskušanja z agonistom in antagonistom, tako da se oceni EC_{50} ali IC_{50} referenčnega standarda. Poleg tega je treba spremljati relativno indukcijo vzorca pozitivne kontrole (PC) in vzorca negativne kontrole (NC). Rezultati se morajo ujemati z merili za sprejemljivost biološkega preskusa z agonistom (preglednica 3C) ali antagonistom ERα CALUX (preglednica 4C). Referenčni standardi ter pozitivne in negativne kontrole so navedeni v preglednicah 1 in 2 za agonistični oziroma antagonistični način.

Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na plošče

13. Celice U2OS je treba kultivirati v gojišču (medij DMEM/F12 (1: 1) s fenol rdečim kot indikatorjem pH, ki so mu dodani fetusni serum goveda (7,5 %), neesencialne aminokisline (1 %), 10 enot/ml penicilina, streptomicina in geneticina (G-418) kot selektivni označevalec). Celice je treba namestiti v inkubator s CO_2 (5 % CO_2) pri 37 °C in 100-odstotni vlažnosti. Ko celice dosežejo 85–95-odstotno konfluenco, jih je treba kultivirati v novem gojišču ali pripraviti za nasaditev na 96-jamične mikrotitrske plošče. V zadnjenavedenem primeru je treba celice resuspendirati pri 1×10^5 celic/ml v preskusnem mediju brez estrogena (medij DMEM/F12 (1: 1) brez fenol rdečega, ki so mu dodani fetusni serum goveda, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (5 vol. %), neesencialne aminokisline (1 vol. %) ter 10 enot/ml penicilina in streptomicina) in jih nasaditi na 96-jamične mikrotitrske plošče (100 µl homogenizirane celične suspenzije). Celice je treba 24 ur pred izpostavitvijo namestiti v inkubator s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C in 100-odstotna vlažnost). Plastična oprema mora biti brez estrogena.

▼M8

Merila za sprejemljivost

14. Agonistično in antagonistično delovanje preskusnih kemikalij se preskusita v preskusnih serijah. Preskusno serijo sestavlja največ 6 mikrotitrskih plošč. Vsaka preskusna serija vsebuje vsaj eno celotno serijo razredčin referenčnega standarda, pozitivni kontrolni vzorec, negativni kontrolni vzorec in kontrolo s topilom. Na slikah 1 in 2 je prikazana priprava plošče za serijo agonističnih in antagonističnih preskusov.

15. Vsako razredčino referenčnih standardov, preskusnih kemikalij, vseh kontrol s topilom ter pozitivnih in negativnih kontrol je treba analizirati v treh ponovitvah. Vsaka analiza treh ponovitev mora izpolnjevati zahteve iz preglednic 3A in 4A.

16. Celotna serija razredčin referenčnega standarda (17β-estradiola za agonizem; tamoksifen za antagonizem) se pri vsaki preskusni seriji meri na prvi plošči. Da se omogoči primerjava rezultatov analize preostalih 5 mikrotitrskih plošč s prvo mikrotitrsko ploščo, ki vsebuje celotno krivuljo odziva na koncentracijo za referenčni standard, morajo vse plošče vsebovati 3 kontrolne vzorce: kontrolo s topilom, najvišjo preskušeno koncentracijo referenčnega standarda in približno koncentracijo EC_{50} (agonizem) ali IC_{50} (antagonizem) referenčnega standarda. Delež povprečnih kontrolnih vzorcev na prvi plošči in preostalih 5 ploščah mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).

17. Za vsako od mikrotitrskih plošč v preskusni seriji se izračuna z-faktor (10). Z-faktor je treba izračunati z uporabo odzivov pri najvišji in najnižji koncentraciji referenčnega standarda. Mikrotitrska plošča se šteje za veljavno, če izpolnjuje zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).

18. Referenčni standard mora prikazovati sigmoidno krivuljo odziva na odmerek. EC_{50} ali IC_{50}, izpeljan iz odziva serije razredčin referenčnega standarda, mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).

19. Vsaka preskusna serija mora vsebovati pozitiven in negativen kontrolni vzorec. Izračunana relativna indukcija pozitivnega in negativnega kontrolnega vzorca mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).

20. Med vsemi meritvami je treba indukcijski faktor najvišje koncentracije referenčnega standarda meriti tako, da se povprečni največji odziv relativne svetlobne enote (RLU) referenčnega standarda 17β-estradiola deli s povprečnim odzivom RLU referenčne kontrole s topilom. Ta indukcijski faktor mora izpolnjevati minimalne zahteve za razmerje indukcije, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).

21. Samo mikrotitrske plošče, ki izpolnjujejo vsa zgoraj navedena merila za sprejemljivost, se lahko štejejo za veljavne in se lahko uporabijo za oceno odziva preskusnih kemikalij.

22. Merila za sprejemljivost se uporabljajo za predhodne presejalne ponovitve in celovite ponovitve.

▼M8

Preglednica 1

Koncentracije referenčnega standarda, pozitivne kontrole (PC) in negativne kontrole (NC) za agonistični biološki preskus CALUX

	Snov	Št. CAS	Razpon preskusa (M)
Referenčni standard	17β-estradiol	50-28-2	od $1 * 10^{-13}$ do $1 * 10^{-10}$
Pozitivna kontrola (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3 * 10^{-6}$
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1 * 10^{-8}$

Preglednica 2

Koncentracije referenčnega standarda, pozitivne kontrole (PC) in negativne kontrole (NC) za antagonistični biološki preskus CALUX

	Snov	Št. CAS	Razpon preskusa (M)
Referenčni standard	tamoksifen	10540-29-1	od $3 * 10^{-9}$ do $1 * 10^{-5}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1 * 10^{-9}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1 * 10^{-5}$

Preglednica 3

Merila za sprejemljivost agonističnega biološkega preskusa ERα CALUX

A – posamezni vzorci na plošči		Merilo
1	Največji delež SO treh jamic (za negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, vsako razredčino preskusne kemikalije in referenčnega standarda, razen C0)	< 15 %
2	Največji delež SO treh jamic (za referenčni standard in kontrole preskusne kemikalije s topilom (C0, kontrola s topilom))	< 30 %
3	Največje uhajanje LDH kot merilo citotoksičnosti	< 120 %
B – na posamezni mikrotitrski plošči		
4	Razmerje med kontrolo referenčnega standarda s topilom (C0; plošča 1) in kontrolo preskusne kemikalije s topilom (kontrola s topilom; plošče 2 do x)	od 0,5 do 2,0
5	Razmerje med pribl. EC50 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na plošči 1 ter pribl. EC50 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C4, C8)	od 0,70 do 1,30
6	Z-faktor za vsako ploščo	> 0,6
C – v posamezni seriji analiz (vse plošče v eni seriji)		
7	Sigmoidna krivulja referenčnega standarda	da (17ß-estradiol)
8	Referenčni standard 17ß-estradiol v območju EC50	od $4 * 10^{-12}$ do $4 * 10^{-11}$ M
9	Najnižje razmerje indukcije najvišje koncentracije 17ß-estradiola glede na kontrolo referenčnega standarda s topilom	5
10	Relativna indukcija (%) pozitivne kontrole	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) negativne kontrole	< 10 %

▼M8

Pribl.: približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola preskusne kemikalije s topilom; C0: kontrola referenčnega standarda s topilom; SO: standardni odklon; LDH: laktat dehidrogenaza.

Preglednica 4

Merila za sprejemljivost antagonističnega biološkega preskusa ERα CALUX

A – posamezni vzorci na plošči		Merilo
1	Največji delež SO treh jamic (za negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, vsako razredčino preskusne kemikalije in referenčnega standarda, kontrolo s topilom (C0))	< 15 %
2	Največji delež SO treh jamic (za kontrolo z vehiklom (VC) in najvišjo koncentracijo referenčnega standarda (C8))	< 30 %
3	Največje uhajanje LDH kot merilo citotoksičnosti	< 120 %
B – na posamezni mikrotitrski plošči		
4	Razmerje med kontrolo referenčnega standarda s topilom (C0; plošča 1) in kontrolo preskusne kemikalije s topilom (kontrola s topilom; plošče 2 do x)	od 0,70 do 1,30
5	Razmerje med pribl. IC50 koncentracij referenčnega standarda na plošči 1 in pribl. EC50 koncentracij referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C4)	od 0,70 do 1,30
6	Razmerje med najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na plošči 1 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C8)	od 0,50 do 2,0
7	Z-faktor za vsako ploščo	> 0,6
C – v posamezni seriji analiz (vse plošče v eni seriji)		
8	Sigmoidna krivulja referenčnega standarda	da (tamoksifen)
9	Območje IC_{50} referenčnega standarda (tamoksifen)	od $1 * 10^{-8}$ do $1 * 10^{-7}$ M
10	Najnižje razmerje indukcije kontrole referenčnega standarda s topilom glede na najvišjo koncentracijo tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) pozitivne kontrole	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) negativne kontrole	> 85 %

Pribl.: približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola z vehiklom (kontrola s topilom brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda); SC: kontrola preskusne kemikalije s topilom; C0: kontrola referenčnega standarda s topilom; SO: standardni odklon; LDH: laktat dehidrogenaza.

Kontrola s topilom/vehiklom, referenčni standardi, pozitivne kontrole, negativne kontrole

23. Tako za predhodno presejalno ponovitev kot za celovite ponovitve je treba uporabiti iste kontrole s topilom/vehiklom, referenčne standarde, pozitivne kontrole in negativne kontrole. Poleg tega morajo biti koncentracije referenčnih standardov, pozitivnih kontrol in negativnih kontrol enake.

▼**M8**

Kontrola s topilom

24. Topilo, ki se uporabi za raztopitev preskusne kemikalije, je treba preskusiti kot kontrolo s topilom. Kot vehikel je bil med validacijo biološkega preskusa ERα CALUX uporabljen dimetilsulfoksid (DMSO, 1 vol. %; CASRN 67-68-5). Če se uporabi drugo topilo, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu. Upoštevati je treba, da kontrola s topilom za antagonistične študije vsebuje fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola (približno koncentracija EC_{50}). Za preskušanje topila, uporabljenega za antagonistične študije, je treba pripraviti in preskusiti kontrolo z vehiklom.

Kontrola z vehiklom (antagonizem)

25. Za preskušanje antagonizma se preskusnemu mediju doda fiksna koncentracija agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola (približno koncentracija EC_{50}). Za preskus topila, uporabljenega za raztopitev preskusnih kemikalij za antagonizem, je treba pripraviti preskusni medij brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola. Ta kontrolni vzorec se označi kot kontrola z vehiklom. Kot vehikel je bil med validacijo biološkega preskusa ERα CALUX uporabljen dimetilsulfoksid (DMSO, 1 vol. %; CASRN 67-68-5). Če se uporabi drugo topilo, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu.

Referenčni standardi

26. Agonistični referenčni standard je 17β-estradiol (preglednica 1). Referenčni standardi obsegajo serijo razredčin osmih koncentracij 17β-estradiola ($1 * 10^{-13}$, $3 * 10^{-13}$, $1 * 10^{-12}$, $3 * 10^{-12}$, $6 * 10^{-12}$, $1 * 10^{-11}$, $3 * 10^{-11}$, $1 * 10^{-10}$ M).

27. Antagonistični referenčni standard je tamoksifen (preglednica 2). Referenčni standardi obsegajo serijo razredčin osmih koncentracij tamoksifena ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Vsaka od koncentracij antagonističnega referenčnega standarda se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola ($3 * 10^{-12}$ M).

Pozitivna kontrola

28. Pozitivna kontrola za agonistične študije je 17α-metiltestosteron (preglednica 1).

29. Pozitivna kontrola za antagonistične študije je 4-hidroksitamoksifen (preglednica 2). Antagonistična pozitivna kontrola se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola ($3 * 10^{-12}$ M).

Negativna kontrola

30. Negativna kontrola za agonistične študije je kortikosteron (preglednica 1).

31. Negativna kontrola za antagonistične študije je resveratrol (preglednica 2). Antagonistična negativna kontrola se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola ($3 * 10^{-12}$ M).

▼M8

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“ te preskusne metode)

Vehikel

32. Topilo, ki se uporabi za raztapljanje preskusnih kemikalij, mora preskusno kemikalijo raztopiti v celoti in se mešati s celičnim gojiščem. Primerna topila so DMSO, voda in etanol (od 95- do 100-odstotna čistost). Če se kot topilo uporabi DMSO, največja koncentracija DMSO med inkubacijo ne sme preseči 1 vol. %. Pred uporabo je treba topilo preskusiti, da ni citotoksično in ne moti učinkovitosti preskusov.

Priprava referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij

33. Referenčni standardi, pozitivne kontrole, negativne kontrole in preskusne kemikalije se raztopijo v 100-odstotnem DMSO (ali ustreznem topilu). Nato je treba v istem topilu pripraviti ustrezne (zaporedne) razredčine. Preden se snovi raztopijo, je treba vse pustiti, da se prilagodijo na sobno temperaturo. Sveže pripravljene osnovne raztopine referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij ne smejo imeti vidne oborine ali motnosti. Zaloge referenčnih standardov in kontrol se lahko pripravijo v večjih količinah. Pred vsakim poskusom je treba pripraviti sveže osnovne raztopine preskusnih kemikalij. Za vsak poskus je treba pripraviti sveže končne razredčine referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij ter jih porabiti v 24 urah po pripravi.

Topnost, citotoksičnost in določanje območja

34. Med predhodno presejalno ponovitvijo se določi topnost preskusnih kemikalij v izbranem topilu. Pripravi se najvišja osnovna koncentracija, ki znaša 0,1 M. Če se pri tej koncentraciji pokažejo težave s topnostjo, je treba pripraviti nižje osnovne raztopine, dokler niso preskusne kemikalije v celoti raztopljene. Med predhodno presejalno ponovitvijo se preskusijo zaporedne razredčine preskusne kemikalije v razmerju 1: 10. Najvišja preskusna koncentracija za preskušanje z agonistom in antagonistom je 1 mM. Po predhodnem presejalnem pregledu se izpelje ustrezno izpopolnjeno območje koncentracije za preskusne kemikalije, ki ga je treba preskusiti med celovitimi ponovitvami. Razredčine, uporabljene za celovito preskušanje, morajo znašati 1-, 3-, 10-, 30-, 100-, 300-, 1000- in 3000-kratnik koncentracije.

35. Preskušanje citotoksičnosti je vključeno v protokole preskusov z agonistom in antagonistom (11). Preskušanje citotoksičnosti je del predhodne presejalne ponovitve in celovitih ponovitev. Metoda, uporabljena za oceno citotoksičnosti med validacijo biološkega preskusa ERα CALUX, je bil preskus uhajanja laktata dehidrogenaze (LDH) v kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom celic (glej Dodatek 4.1) po izpostavitvi preskusnim kemikalijam. Vendar se lahko uporabijo tudi druge kvantitativne metode za določitev citotoksičnosti (npr. tetrazolijev kolorimetrični preskus (MTT) ali biološki preskus citotoksičnosti CALUX). Na splošno se koncentracije preskusnih kemikalij, pri katerih se kaže več kot 20-odstotno zmanjšanje viabilnosti celic, štejejo za citotoksične in jih zato ni mogoče uporabiti za oceno podatkov. Kar zadeva preskus uhajanja LDH, se koncentracija preskusne kemikalije šteje za citotoksično, če delež uhajanja LDH presega 120 %.

▼M8

Izpostavitev preskusni kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči

36. Po tripsinizaciji konfluentne bučke z gojenimi celicami se celice resuspendirajo pri 1×10^5 celic/ml v preskusnem mediju brez estrogena. 100 µl resuspendiranih celic se nasadi v jamice na notranjem delu 96-jamične mikrotitrske plošče. Jamice na robu se napolnijo z 200 µl fosfatnega pufra s soljo (PBS) (glej sliki 1 in 2). Nasajene celice se 24 ur predinkubirajo v inkubatorju s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100-odstotna vlažnost).

37. Po predinkubaciji se plošče pregledajo za vidno citotoksičnost (glej Dodatek 4.1), kontaminacijo in konfluenco. Za preskušanje se uporabijo samo plošče, pri katerih se ne kažeta vidna citotoksičnost in kontaminacija ter ki imajo vsaj 85-odstotno konfluenco. Medij se iz notranjih jamic previdno odstrani in nadomesti z 200 µl preskusnega medija brez estrogena, ki vsebuje ustrezne zaporedne razredčine referenčnih standardov, preskusnih kemikalij, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in kontrol s topilom (preglednica 5: študije z agonistom; preglednica 6: študije z antagonistom). Vsi referenčni standardi, preskusne kemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole in kontrole s topilom se preskusijo v treh ponovitvah. Na sliki 1 je prikazana razporeditev na plošči za preskušanje z agonistom. Na sliki 2 je prikazana razporeditev na plošči za preskušanje z antagonistom. Razporeditev na plošči za predhodno presejalno preskušanje in celovito preskušanje je enaka. Pri preskušanju z antagonistom vse notranje jamice, razen jamic za kontrolo z vehiklom (VC), vsebujejo tudi fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola ($3 * 10^{-12}$ M). Upoštevati je treba, da je treba referenčna standarda C8 in C4 dodati na vsako ploščo s preskusno kemikalijo.

38. Po izpostavitvi celic vsem kemikalijam je treba 96-jamične mikrotitrske plošče še 24 ur inkubirati v inkubatorju s CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100-odstotna vlažnost).

Slika 1

Razporeditev na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah za predhodno presejanje in oceno agonističnega učinka

Plošča 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Naslednje plošče

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = topilo z referenčnim standardom.

C(1–8) = serija razredčin (1–8, od nizke do visoke koncentracije) referenčnega standarda.

▼M8

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1–8) = razredčine (1–8, od nizke do visoke koncentracije) preskusne kemikalije za predhodno presejalno ponovitev in oceno agonističnega učinka preskusne kemikalije x.

SC = kontrola preskusne kemikalije s topilom (optimalno enako topilo kot v C0, vendar po možnosti iz druge serije).

Sive celice: = zunanje jamice, napolnjene z 200 µl PBS.

Slika 2

Razporeditev na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah za predhodno antagonistično presejanje in oceno antagonističnega učinka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Naslednje plošče

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = topilo z referenčnim standardom.

C(1–8) = serija razredčin (1–8, od nizke do visoke koncentracije) referenčnega standarda.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1–8) = razredčine (1–8, od nizke do visoke koncentracije) preskusne kemikalije za predhodno presejalno ponovitev in oceno agonističnega učinka preskusne kemikalije x.

SC = kontrola preskusne kemikalije s topilom (optimalno enako topilo kot v C0, vendar po možnosti iz druge serije).

VC = kontrola z vehiklom (kontrola s topilom brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola).

Sive celice: = zunanje jamice, napolnjene z 200 µl PBS.

Opomba: vse notranje jamice, razen jamic za kontrolo z vehiklom (VC), vsebujejo tudi fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola ($3{,}0*10^{-12}$ M).

Merjenje luminiscence

39. Merjenje luminiscence je podrobno opisano v protokolih za preskuse z agonistom in antagonistom (10). Medij je treba odstraniti iz jamic in celice po 24 urah inkubiranja lizirati, da se odpre celična membrana in omogoči merjenje luciferazne aktivnosti.

▼M8

40. Za merjenje luminiscence je pri tem postopku potreben luminometer, opremljen z dvema injektorjema. Luciferazna reakcija se začne z injiciranjem substrata luciferina, ustavi pa se tako, da se doda 0,2 M NaOH. Reakcija se ustavi, da se prepreči prenos luminiscence z ene jamice na drugo.

41. Svetloba, oddana iz vsake jamice, se izrazi kot relativna svetlobna enota (RLU) na jamico.

Predhodna izvedba presejanja

42. Na podlagi rezultatov predhodne presejalne analize se določi izpopolnjeno območje koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje. Ocena rezultatov predhodne presejalne analize in določitev izpopolnjenega območja koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje sta podrobno opisani v protokolih za preskus z agonistom in antagonistom (10). V nadaljevanju je kratek povzetek postopkov za določitev območja koncentracije preskusnih kemikalij za preskušanje z agonistom in antagonistom. Za navodila glede zasnove zaporednega redčenja glej preglednici 5 in 6.

Izbira koncentracij za oceno agonističnih učinkov

43. Med predhodno presejalno ponovitvijo je treba preskusne kemikalije preskusiti z uporabo serije razredčin, kot so navedene v preglednicah 5 (agonizem) in 6 (antagonizem). Vse koncentracije je treba preskusiti v treh jamicah v skladu z razporeditvijo na plošči, navedeno na sliki 1 (agonizem) ali 2 (antagonizem).

44. Samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednica 3), se štejejo za veljavne in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrske plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).

45. Začetna območja koncentracije preskusnih kemikalij je treba prilagoditi in predhodno presejalno ponovitev ponoviti, če:

— je opažena citotoksičnost. Postopek predhodnega presejanja je treba ponoviti z nižjimi necitotoksičnimi koncentracijami preskusne kemikalije;

— predhodno presejanje preskusne kemikalije ne pokaže celotne krivulje odziva na odmerek, ker preskušene koncentracije povzročajo največjo indukcijo. Predhodno presejalno ponovitev je treba ponoviti z nižjimi koncentracijami preskusne kemikalije.

46. Če je opažen ustrezen z odmerkom povezan odziv, je treba izbrati (najnižjo) koncentracijo, pri kateri je opažena največja indukcija in ki ne kaže citotoksičnosti. Najvišja koncentracija preskusne kemikalije, ki jo je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, mora biti trikratnik te izbrane koncentracije.

47. S koraki redčenja, navedenimi v preglednici 5, je treba pripraviti celotno izpopolnjeno serijo razredčin preskusne kemikalije, tako da se začne z najvišjo koncentracijo, kot je določena zgoraj.

▼M8

48. Preskusno kemikalijo, ki ne povzroči nobenega agonističnega učinka, je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, tako da se začne z najvišjo necitotoksično koncentracijo, opredeljeno med predhodnim presejalnim pregledom.

Izbira koncentracij za oceno antagonističnih učinkov

49. Za veljavne se štejejo samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednica 4), in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrske plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).

50. Začetna območja koncentracije preskusnih kemikalij je treba prilagoditi in predhodno presejalno ponovitev ponoviti, če:

— je opažena citotoksičnost. Postopek predhodnega presejanja je treba ponoviti z nižjimi necitotoksičnimi koncentracijami preskusne kemikalije;

— predhodno presejanje preskusne kemikalije ne pokaže celotne krivulje odziva na odmerek, ker preskušene koncentracije povzročajo največjo inhibicijo. Predhodno presejanje je treba ponoviti z nižjimi koncentracijami preskusne kemikalije.

51. Če je ugotovljen ustrezen z odmerkom povezan odziv, je treba izbrati (najnižjo) koncentracijo, pri kateri je opažena največja inhibicija in ki ne kaže citotoksičnosti. Najvišja koncentracija preskusne kemikalije, ki jo je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, mora biti trikratnik te izbrane koncentracije.

52. S koraki redčenja, navedenimi v preglednici 6, je treba pripraviti celotno izpopolnjeno serijo razredčin preskusne kemikalije, tako da se začne z najvišjo koncentracijo, kot je določena zgoraj.

53. Preskusne kemikalije, ki ne povzročijo nobenih antagonističnih učinkov, je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, tako da se začne z najvišjo necitotoksično koncentracijo, preskušeno med predhodnim presejalnim pregledom.

Celovite ponovitve

54. Po izbiri izpopolnjenih območij koncentracije je treba preskusne kemikalije celovito preskusiti z uporabo serije razredčin, navedenih v preglednicah 5 (agonizem) in 6 (antagonizem). Vse koncentracije je treba preskusiti v treh jamicah v skladu z razporeditvijo na plošči, navedeno na sliki 1 (agonizem) ali 2 (antagonizem).

55. Samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednici 3 in 4), se štejejo za veljavne in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrske plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).

▼**M8**

Preglednica 5

Koncentracija in razredčine referenčnih standardov, kontrol in preskusnih kemikalij, uporabljenih za preskušanje z agonistom

Referenčni 17β-estradiol		Tcx – predhodna presejalna ponovitev		TCx – celovita ponovitev		Kontrole	
konc. (M)		razredčina		razredčina		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3 * 10^{-6}$
C1	$1 * 10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1 * 10^{-8}$
C2	$3 * 10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1 * 10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3 * 10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6 * 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1 * 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3 * 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1 * 10^{-10}$						

TCx – preskusna kemikalija x.
PC – pozitivna kontrola (17α-metiltestosteron).
NC – negativna kontrola (kortikosteron).
C0 – kontrola referenčnega standarda s topilom.
SC – kontrola preskusne kemikalije s topilom.

▼M8

Preglednica 6

Koncentracija in razredčine referenčnih standardov, kontrol in preskusnih kemikalij, uporabljenih za preskušanje z antagonistom

Referenčni tamoksifen		Tcx – predhodna presejalna ponovitev		TCx – celovita ponovitev		Kontrole	
konc. (M)		razredčina		razredčina		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1 * 10^{-9}$
C1	$3 * 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1 * 10^{-5}$
C2	$1 * 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3 * 10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1 * 10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Dodani agonist**	
C6	$1 * 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3 * 10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3 * 10^{-12}$
C8	$1 * 10^{-5}$						

TCx – preskusna kemikalija x.

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen).

NC – negativna kontrola (resveratrol).

C0 – kontrola referenčnega standarda s topilom.

SC – kontrola preskusne kemikalije s topilom.VC – kontrola z vehiklom (ne vsebuje fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17β-estradiola ($3,0 * 10^{-12}$ M).

▼M8

Zbiranje podatkov in podatkovna analiza

56. Po predhodnih presejalnih in celovitih ponovitvah je treba določiti EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} in največjo indukcijo (TCx_{max}) preskusne kemikalije za agonistično preskušanje. Za antagonistično preskušanje je treba izračunati IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} in najmanjšo indukcijo (TCx_{min}). Na slikah 3 (agonizem) in 4 (antagonizem) so ti parametri grafično prikazani. Potrebni parametri se izračunajo na podlagi relativne indukcije vsake preskusne kemikalije (glede na največjo indukcijo referenčnega standarda (= 100 %)). Za oceno podatkov je treba uporabiti nelinearno regresijo (variabilni naklon, 4 parametri) v skladu z naslednjo enačbo:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hillov\ naklon}$$

pri čemer je:

X = logaritem odmerka ali koncentracije

da = odziv (relativna indukcija (%))

Vrh = največja indukcija (%)

Dno = najmanjša indukcija (%)

$LogEC_{50}$ = logaritem koncentracije, pri kateri je opaženih 50 % največjega odziva

Hillov naklon = naklonski faktor ali Hillov naklon

57. Neobdelane podatke iz luminometra, izražene kot relativne svetlobne enote (RLU), je treba prenesti v preglednico za podatkovno analizo, zasnovano za predhodne presejalne in celovite ponovitve. Neobdelani podatki morajo izpolnjevati merila za sprejemljivost, kot so navedena v preglednicah 3A in 3B (agonizem) ali 4A in 4B (antagonizem). Če neobdelani podatki izpolnjujejo merila za sprejemljivost, se za določitev potrebnih parametrov izvedejo v nadaljevanju navedeni računski koraki.

Agonizem

— Povprečno RLU kontrole referenčnega standarda s topilom odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize referenčnih standardov.

— Povprečno RLU za kontrolo preskusne kemikalije s topilom odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize preskusnih kemikalij.

— Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije referenčnega standarda. Indukcijo najvišje koncentracije referenčnega standarda nastavite na 100 %.

— Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije preskusne kemikalije v primerjavi z najvišjo koncentracijo referenčnega standarda kot 100 %.

— Ocenite rezultate analize na podlagi nelinearne regresije (variabilni naklon, 4 parametri).

▼M8

— Določite EC_{50} in EC_{10} referenčnega standarda.

— Določite EC_{50} in EC_{10} preskusnih kemikalij.

— Določite največjo relativno indukcijo preskusne kemikalije (TC_{max}).

— Določite PC_{10} in PC_{50} preskusnih kemikalij.

Pri preskusnih kemikalijah ni vedno mogoče dobiti celotne krivulje odziva na odmerek, npr. zaradi težav s citotoksičnostjo ali topnostjo. Zato EC_{50}, EC_{10} in PC_{50} ni mogoče določiti. V takem primeru se lahko določita samo PC_{10} in TC_{max}.

Antagonizem

— Povprečno RLU najvišje koncentracije referenčnega standarda odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize referenčnih standardov.

— Povprečno RLU najvišje koncentracije referenčnega standarda odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize preskusnih kemikalij.

— Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije referenčnega standarda. Indukcijo najnižje koncentracije referenčnega standarda nastavite na 100 %.

— Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije preskusne kemikalije v primerjavi z najnižjo koncentracijo referenčnega standarda kot 100 %.

— Ocenite rezultate analize na podlagi nelinearne regresije (variabilni naklon, 4 parametri).

— Določite IC_{50} in IC_{20} referenčnega standarda.

— Določite IC_{50} in IC_{20} preskusnih kemikalij.

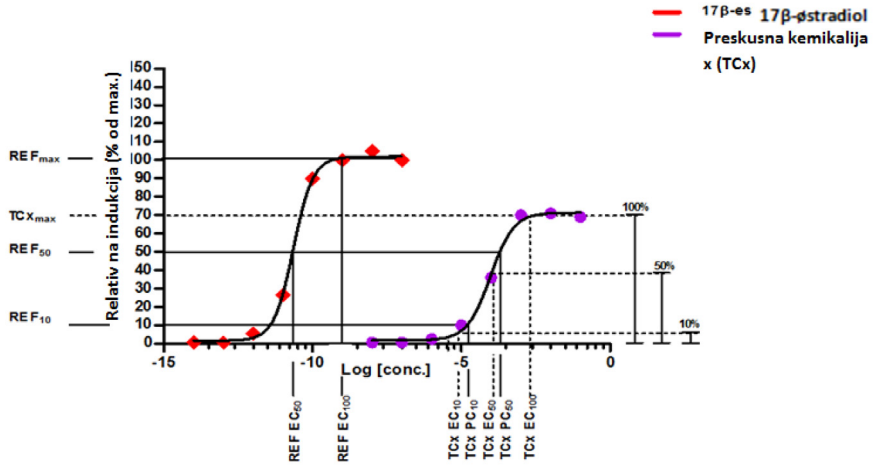
— Določite najmanjšo relativno indukcijo preskusne kemikalije ($TC_{min.}$).

— Določite PC_{80} in PC_{50} preskusnih kemikalij.

▼M8

Slika 3

Pregled parametrov, določenih pri preskusu z agonistom



EC_{10} = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 10 % njenega največjega odziva.

EC_{50} = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 50 % njenega največjega odziva.

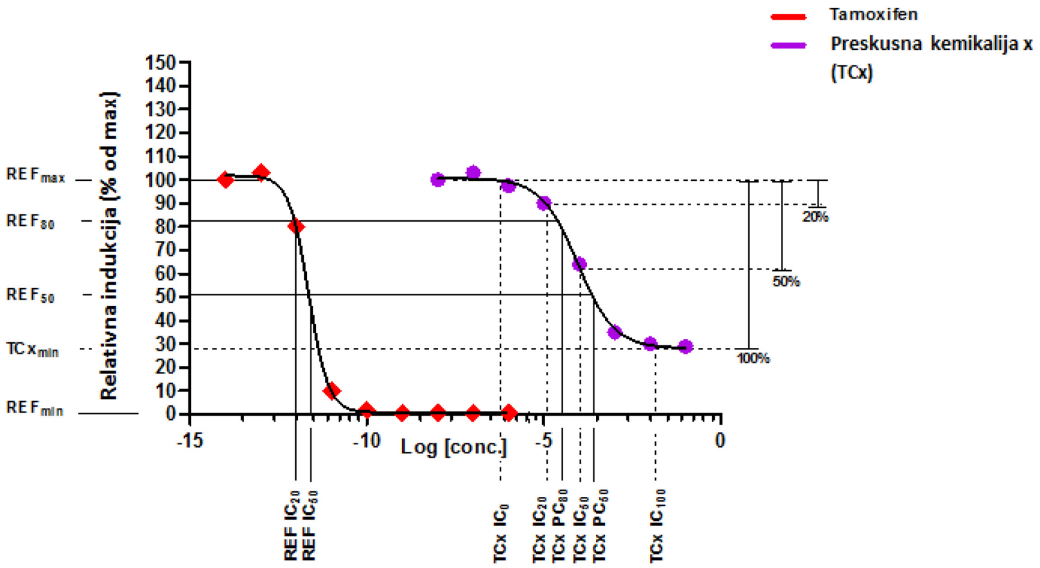
PC_{10} = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak EC_{10} referenčnega standarda.

PC_{50} = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak EC_{50} referenčnega standarda.

TCx_{max} = največja relativna indukcija preskusne kemikalije.

Slika 4

Pregled parametrov, določenih pri preskusu z antagonistom



IC20 = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 80 % njenega največjega odziva (20-odstotna inhibicija).

▼**M8**

IC50 = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 50 % njenega največjega odziva (50-odstotna inhibicija).

PC80 = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak IC20 referenčnega standarda.

PC50 = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak IC50 referenčnega standarda.

TCxmin = najmanjša relativna indukcija preskusne kemikalije.

Pri preskusnih kemikalijah ni vedno mogoče dobiti celotne krivulje odziva na odmerek, npr. zaradi težav s citotoksičnostjo ali topnostjo. Zato IC_{50}, IC_{20} in PC_{50} ni mogoče določiti. V takem primeru se lahko določita samo PC_{20} in TC_{min}.

58. Rezultati morajo temeljiti na dveh (ali treh) neodvisnih ponovitvah. Če se z dvema ponovitvama dobijo primerljivi in torej obnovljivi rezultati, tretje ponovitve ni treba izvesti. Rezultati so sprejemljivi, če:

— izpolnjujejo merila za sprejemljivost (glej Merila za sprejemljivost v odstavkih 14–22),

— so obnovljivi.

Merila za razlago rezultatov

59. Pri razlagi podatkov in odločanju, ali se preskusna kemikalija šteje za pozitivno ali negativno, je treba uporabiti v nadaljevanju navedena merila.

Agonizem

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **pozitivno**, če:

1 je TC_{max} najmanj enak 10 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{10});

2 sta vsaj dve zaporedni koncentraciji preskusne kemikalije najmanj enaki REF_{10}.

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **negativno**, če:

1 TC_{max} ne presega 10 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{10});

2 sta manj kot dve koncentraciji preskusne kemikalije najmanj enaki REF10.

Antagonizem

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **pozitivno**, če:

1 je TCmin največ enak 80 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{80} = 20-odstotna inhibicija);

2 sta vsaj dve zaporedni koncentraciji preskusne kemikalije največ enaki REF_{80}.

▼**M8**

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **negativno**, če:

1 TC_{min} presega 80 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{80} = 20-odstotna inhibicija);

2 sta manj kot 2 koncentraciji preskusne kemikalije največ enaki REF_{80}.

60. Da se opredeli jakost pozitivnega odziva preskusne kemikalije, je treba navesti velikost učinka (agonizem: TC_{max}; antagonizem: TC_{min}) in koncentracijo, pri kateri se učinek pojavi (agonizem: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonizem: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

POROČILO O PRESKUSU

61. Glej odstavek 20 „ELEMENTI PRESKUSA TA ER“.

VIRI

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 240). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A., in van der Burg, B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136–148.

(3) Quaedackers, M. E., van den Brink, C. E., Wissink, S., Schreurs, R. H. M. M., Gustafsson, J. A., van der Saag, P. T., in van der Burg, B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156–1166.

(4) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6): 646–57.

(5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J. C., Cavaillès, V., in Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459–1469.

(6) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., in Gustafsson, J. A.. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252–4263.

(7) Sotoca, A. M., Bovee, T. F. H, Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld, E., Riteco, J. A. C., Jansen, H. J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W. G., in van der Burg, B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M., in Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769–771.

(10) Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y, in Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67–73.

(11) Besselink, H., Middelhof, I., in Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nizozemska.

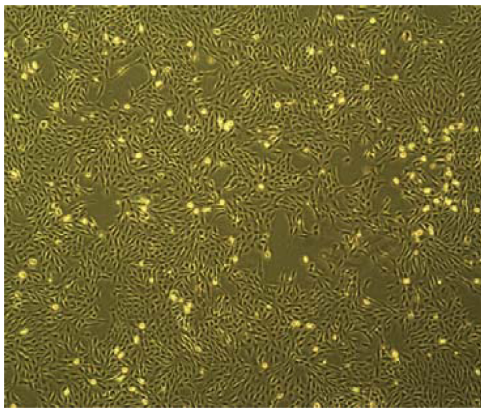
▼**M8**

Dodatek 4.1:

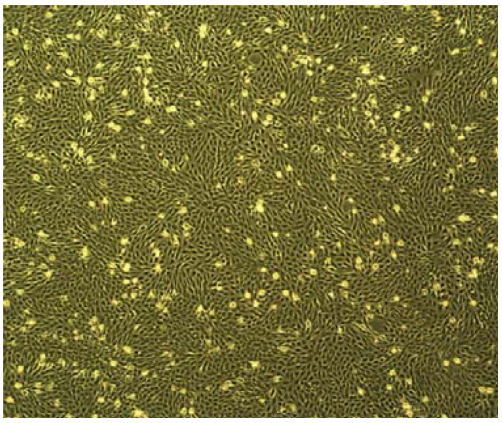
VIZUALNI PREGLED VIABILNOSTI CELIC



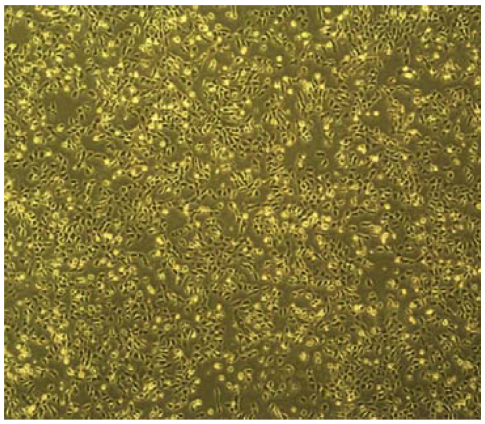
< 5-odstotna konfluenca. Celice so bile pravkar nasajene. 100-odstotna viabilnost celic. Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



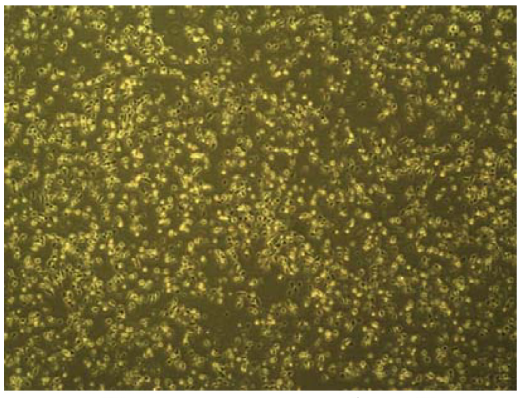
> 85-odstotna konfluenca. V tej fazi se celice izpostavijo preskusnim kemikalijam. > 95-odstotna viabilnost celic.
Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



> 95-odstotna konfluenca. Celice so gosto natlačene in se začenjajo preveč razraščati. > 95-odstotna viabilnost celic.
Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



< 25-odstotna viabilnost celic. Celice se ločijo in stik med celicami se zmanjša. Celice so zaokrožene. Razvrstitev: „citotoksičnost“.



< 5-odstotna viabilnost celic. Celice so popolnoma ločene, stik med njimi je pretrgan. Celice so zaokrožene. Razvrstitev: „citotoksičnost“.

▼M8

B.67 *IN VITRO* PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENA ZA TIMIDIN KINAZO

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 490 (2016). Preskusne metode se redno pregledujejo in revidirajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, regulativnih zahtev in dobrobiti živali. Preskus z limfomom miši (MLA) in preskus TK6 z uporabo lokusa za timidin kinazo (TK) je prvotno vsebovala preskusna metoda B.17. Pozneje je strokovna skupina za MLA mednarodne delavnice o preskušanju genotoksičnosti (IWGT) razvila mednarodno usklajena priporočila v zvezi z merili za sprejemljivost preskusa in razlago podatkov v zvezi z MLA (1) (2) (3) (4) (5), ki so vključena v to novo preskusno metodo B.67. Ta preskusna metoda je napisana za preskus MLA, in ker se pri njej uporablja tudi lokus za TK, preskus TK6. Medtem ko je bila uporaba preskusa MLA za regulativne namene zelo razširjena, se je preskus TK6 uporabljal precej redkeje. Opozoriti je treba, da kljub podobnosti med končnimi točkami ti celični liniji nista medsebojno zamenljivi, v regulativnih programih pa se lahko za določeno regulativno uporabo upravičeno daje prednost eni pred drugo. Validacija preskusa MLA je na primer pokazala njegovo ustreznost za zaznavanje ne le genske mutacije, ampak tudi sposobnosti preskusne kemikalije, da povzroči strukturne kromosomske poškodbe. Ta preskusna metoda je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (6).

2. Namen preskusov genskih mutacij v celicah sesalcev *in vitro* je zaznati genske mutacije, katerih nastanek povzročijo kemikalije. S celičnimi linijami, ki se uporabljajo pri teh preskusih, se merijo napredne mutacije na poročevalskih genih, natančneje endogenem genu za timidin kinazo (*TK* za človeške celice in *Tk* za celice glodavcev, pri tej preskusni metodi skupaj navedene kot *TK*). Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljali dve celični liniji: celična linija limfoma miši L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (na splošno imenovana L5178Y) in človeška limfoblastoidna celična linija TK6 (na splošno imenovana TK6). Čeprav se celični liniji razlikujeta po izvoru, celični rasti, statusu proteina p53 itd., se lahko preskusi genskih mutacij na *TK* pri obeh vrstah celic izvedejo podobno, kot je opisano v tej preskusni metodi.

3. Avtosomalne in heterozigotne lastnosti gena za timidin kinazo omogočajo zaznavo viabilnih kolonij, katerih celicam po mutaciji iz $TK^{+/-}$ v $TK^{-/-}$ primanjkuje encima timidin kinaze. Ta primanjkljaj je lahko posledica genskih pojavov, ki vplivajo na gen *TK*, vključno z obema genskima mutacijama (točkovne mutacije, mutacije premika bralnega okvira, majhne delecije itd.), in kromosomskih pojavov (velike delecije, kromosomske prerazporeditve in mitotična rekombinacija). Zadnjenavedeni pojavi se izrazijo kot izguba heterozigotnosti, ki je pogosta genska sprememba tumor zavirajočih genov v tumorogenosti pri človeku. Teoretično je izgubo celotnega kromosoma, ki nosi gen *TK*, zaradi okvare delitvenega vretena in/ali mitotičnega nerazdvajanja mogoče zaznati pri preskusu MLA. Dejansko kombinacija citogenetske in molekularne analize jasno pokaže, da so nekatere mutante MLA TK posledica nerazdvajanja. Vendar zanesljivost dokazov kaže, da s preskusi mutacij gena *TK* ni mogoče zanesljivo zaznati anevgenov, če se uporabljajo standardna merila za citotoksičnost (kot so opisana v tej preskusni metodi), zato ni ustrezno, da se ti preskusi uporabljajo za zaznavanje anevgenov (7) (8) (9).

▼**M8**

4. Pri preskusih mutacij gena *TK* nastaneta dva različna fenotipska razreda mutant *TK:* normalno rastoče mutante, ki rastejo enako hitro kot heterozigotne celice TK, in počasi rastoče mutante, ki rastejo z daljšimi podvojitvenimi časi. Normalno rastoče in počasi rastoče mutante se pri preskusu MLA prepoznajo kot mutante z velikimi kolonijami in mutante z majhnimi kolonijami, pri preskusu TK6 pa kot mutante z zgodaj nastalimi kolonijami in mutante s pozno nastalimi kolonijami. Molekularne in citogenetske lastnosti mutant z velikimi in majhnimi kolonijami so bile podrobno raziskane (8) (10) (11) (12) (13). Prav tako so bile obširno raziskane molekularne in citogenetske lastnosti zgodaj nastalih in pozno nastalih mutant TK6 (14) (15) (16) (17). Počasi rastoče mutante so pri obeh vrstah celic utrpele genske poškodbe, ki vključujejo domnevne gene za uravnavanje rasti v bližini lokusa *TK*, kar povzroči daljše podvojitvene čase in tvorbo pozno nastalih ali majhnih kolonij (18). Nastanek počasi rastočih mutant se povezuje s kemikalijami, ki povzročajo obsežne strukturne spremembe na ravni kromosomov. Celice, katerih poškodbe ne vključujejo domnevnih genov za uravnavanje rasti v bližini lokusa TK, rastejo podobno hitro kot starševske celice in postanejo normalno rastoče mutante. Nastanek primarno normalno rastočih mutant se povezuje s kemikalijami, ki primarno delujejo kot točkovni mutageni. Zato je nujno, da se preštejejo tako počasi rastoče kot tudi normalno rastoče mutante, da se dobijo vse mutante in se zagotovi določen vpogled v vrste poškodb (mutagene proti klastogenim), ki jih povzroča preskusna kemikalija (10) (12) (18) (19).

5. Preskusna metoda iz smernice za preskušanje je urejena tako, da zagotavlja splošne informacije, ki veljajo za MLA in TK6, ter posebna navodila za posamezne preskuse.

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

7. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti.

8. Paziti je treba, da se preprečijo pogoji, ki bi lahko vodili do lažno pozitivnih rezultatov (tj. morebitnemu medsebojnemu delovanju s preskusnim sistemom), ki jih ne bi povzročilo medsebojno delovanje preskusne kemikalije in genetskega materiala celice; med take pogoje spadajo spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti, medsebojno delovanje sestavin gojišča (20) (21) ali previsoke ravni citotoksičnosti (22) (23) (24). Za citotoksičnost, ki presega priporočene najvišje ravni citotoksičnosti, kot so opredeljene v odstavku 28, se šteje, da je prevelika za preskusa MLA in TK6. Poleg tega je treba opozoriti, da se lahko zaradi preskusnih kemikalij, ki so analogi timidina ali se obnašajo kot analogi timidina, poveča pogostnost mutant s selektivno rastjo spontanih mutant v ozadju med tretiranjem celic in zahtevajo dodatne preskusne metode za ustrezno oceno (25).

9. Pri proizvedenih nanomaterialih so morda potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.

10. Preden se preskusna metoda uporabi za preskušanje zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

▼M8

11. Mutirane celice brez delovanja encima timidin kinaza (TK) zaradi mutacije $TK^{+/-}$ do $TK^{-/-}$ so odporne proti citostatičnim učinkom pirimidinskega analoga trifluorotimidina (TFT). Celice s *TK* so občutljive za TFT, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TFT in tvorijo vidne kolonije, celice, ki vsebujejo encim timidin kinaza, pa ne.

NAČELO PRESKUSA

12. Celice v suspenziji se za ustrezno časovno obdobje (glej odstavek 33) izpostavijo preskusni kemikaliji z zunanjim virom presnovne aktivacije in brez njega (glej odstavek 19), nato pa se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant. Citotoksičnost je določena z relativno skupno rastjo (RTG – glej odstavek 25) pri preskusu MLA in relativnim preživetjem (RS – glej odstavek 26) pri preskusu TK6. Tretirane kulture se vzdržujejo v gojišču dovolj dolgo obdobje, značilno za vsako vrsto celic (glej odstavek 37), ki omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij. Po izražanju fenotipa se pogostnost mutant določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane kolonije, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (viabilnost). Po ustrezno dolgi inkubaciji se preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant.

OPIS METODE

Pripravki

Celice

13. Za preskus MLA: ker je bil preskus MLA razvit in opredeljen z uporabo podlinije $TK^{+/-}$ -3.7.2C celic L5178Y, je treba pri preskusu MLA uporabiti to specifično podlinijo. Celična linija L5178Y je bila pridobljena iz z metilkolantrenom povzročenega timičnega limfoma pri miši DBA-2 (26). Clive in sodelavci so celice L5178Y (ki jih je Clive označil kot $TK^{+/+}$ -3) tretirali z etil-metan-sulfonatom in izolirali klon $TK^{-/-}$ (označen kot $TK^{-/-}$ -3.7), pri čemer so kot selektivno snov uporabili bromdeoksiuridin. Iz klona $TK^{-/-}$ sta bila izolirana spontani klon $TK^{+/-}$ (označen kot $TK^{+/-}$ -3.7.2.) in podklon (označen kot $TK^{+/-}$-3.7.2C) ter sta bila opredeljena za uporabo pri preskusu MLA (27). Kariotip celične linije je bil objavljen (28) (29) (30) (31). Modalno kromosomsko število je 40. Obstaja metacentrični kromosom (t12;13), ki ga je treba šteti kot en kromosom. Lokus *TK* pri miši je na distalnem koncu kromosoma 11. Celična linija L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C ima mutacije na obeh alelih p53 in proizvaja mutiran protein p53 (32) (33). Status proteina p53 v celični liniji $TK^{+/-}$-3.7.2C je verjetno odgovoren za to, da je mogoče s preskusom zaznati obsežne poškodbe (17).

14. Za preskus TK6: TK6 je človeška limfoblastoidna celična linija. Starševska celična linija je z Epstein-Barrovim virusom transformirana celična linija, WI-L2, ki je bila prvotno pridobljena od petletnika z dedno sferocitozo. Prvi izolirani klon HH4 je bil mutiran z ICR191 in nastala je heterozigotna celična linija *TK* – TK6 (34). Celice TK6 so skoraj diploidi, reprezentativni kariotip pa je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Lokus človeškega *TK* je na dolgem kraku kromosoma 17. TK6 je s p53 kompetentna celična linija, ker ima sekvenco divjega tipa p53 na obeh alelih in izraža samo divji tip proteina p53 (36).

▼M8

15. Tako pri preskusu MLA kot tudi pri preskusu TK6 je priporočljivo, da preskuševalni laboratorij ob prvi vzpostavitvi ali dopolnitvi osnovne zaloge zagotovi, da ni okužbe z *mikoplazmo*, določi kariotip celic ali pobarva kromosome z lokusom *TK* ter preveri podvojitvene čase populacije. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celic, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic (16) (19) (37). To osnovno zalogo je treba hraniti pri –150 °C ali manj in uporabiti za pripravo vseh delovnih zalog celic.

16. Pred vzpostavitvijo velikega števila delovnih zalog, shranjenih z zamrzovanjem, ali tik pred uporabo v poskusu je iz kultur morda treba odstraniti že obstoječe mutirane celice (razen če je pogostnost mutant v kontroli s topilom že znotraj sprejemljivega razpona – glej preglednico 2 za preskus MLA). Za to sta potrebna uporaba metotreksata (aminopterina), da se ne izberejo celice brez TK ter dodajanje timidina, hipoksantina in glicina (L5178Y) ali 2'-deoksicitidina (TK6) v kulturo, da se zagotovi optimalna rast s TK kompetentnih celic (19) (38) (39), in (40) za TK6). Splošna navodila za dobro prakso pri vzdrževanju celičnih kultur ter posebna navodila za celice L5178Y in TK6 so na voljo v virih (19) (31) (37) (39) (41). Za laboratorije, ki potrebujejo zaloge izvornih celic za iniciacijo MLA ali TK6 ali pridobitev novih zalog izvornih celic, je na voljo celična shramba z dobro opredeljenimi celicami (37).

Gojišča in pogoji kultiviranja

17. Pri obeh preskusih je treba za vzdrževanje kultur uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (npr. posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO_2, temperatura inkubacije 37 °C). Celične kulture je treba vedno vzdrževati v pogojih, ki zagotavljajo njihovo rast v logaritemski fazi. Posebno pomembno je, da se izberejo takšna gojišča in pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v obdobju izražanja in tvorbo klonov mutiranih in nemutiranih celic. Pri preskusih MLA in TK6 je tudi pomembno, da pogoji kultiviranja zagotavljajo optimalno rast mutant TK z velikimi kolonijami/ki se pojavijo zgodaj in z majhnimi kolonijami/ki se pojavijo pozno. Več podrobnosti o kultiviranju, vključno s potrebo po ustreznem segrevanju neaktivnega konjskega seruma, če se pri selekciji mutant uporablja medij RPMI, je na voljo v virih (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Priprava kultur

18. Celice se namnožijo iz osnovnih kultur in nasadijo v gojišče tako na gosto, da suspenzijske kulture med obdobji tretiranja in izražanja še naprej eksponentno rastejo.

Presnovna aktivacija

19. Pri uporabi celic L5178Y in TK6 je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme, ker imajo neustrezno notranjo sposobnostjo presnavljanja. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev (običajno podgan), ki so bila tretirana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (43) (44) (45), ali mešanico fenobarbitala in β-naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih

▼M8

(52) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (45) (46) (47) (48) (49). Frakcija S9 se na končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Na izbiro vrste in koncentracije zunanjega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred preskusnih kemikalij.

Priprava preskusne kemikalije

20. Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih, in če je ustrezno, razredčiti (glej odstavek 21). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (53) (54) (55). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

PRESKUSNI POGOJI

Topila

21. Izbrati je treba tako topilo, ki optimizira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rast celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila na končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba dodati netretirane kontrole (glej Dodatek 1, Opredelitve pojmov), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

MERJENJE CITOTOKSIČNOSTI IN IZBIRA KONCENTRACIJ ZA TRETIRANJE

22. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažno pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 28), obarjanje (glej odstavek 29) v gojišču ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 8). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufra v končno obdelovalno gojišče, da se preprečijo lažno pozitivni rezultati in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.

23. Izbira koncentracije temelji na citotoksičnosti in drugih preudarkih (glej odstavke 27–30). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Tudi če se izvede začetna ocena citotoksičnosti, je treba pri glavnem preskusu še vedno izmeriti citotoksičnost vsake kulture. Če se izvede poskus za določanje območja, mora zajemati širok razpon koncentracij in se lahko konča prvi dan po tretiranju ali pa se nadaljuje drugi dan izražanja in do selekcije mutant (če se zdi, da so uporabljene koncentracije ustrezne).

▼**M8**

24. Citotoksičnost je treba določiti za vsako posamezno preskusno kulturo in kontrolno kulturo: metode za preskus MLA (2) in preskus TK6 (15) so opredeljene z mednarodno dogovorjeno prakso.

25. Za različici preskusa MLA z agarjem in mikrotitrsko ploščo: Citotoksičnost je treba oceniti z uporabo relativne skupne rasti (RTG), ki sta jo prvotno opredelila Clive in Spector leta 1975 (2). Ta meritev vključuje relativno rast v suspenziji (RSG: preskusna kultura glede na kontrolo s topilom) med tretiranjem celic, čas izražanja in relativno učinkovitost tvorbe klonov (RCE: preskusna kultura glede na kontrolo s topilom) ob selekciji mutant (2). Opozoriti je treba, da relativna rast v suspenziji vključuje morebitno izgubo celic v preskusni kulturi med tretiranjem (za formule glej Dodatek 2).

26. Za preskus TK6: Citotoksičnost je treba oceniti na podlagi relativnega preživetja, tj. učinkovitosti tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeni za morebitno izgubo celic med tretiranjem na podlagi štetja celic v primerjavi z negativno kontrolo (ki se ji pripiše 100-odstotno preživetje) (za formulo glej Dodatek 2).

27. Oceniti je treba vsaj štiri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji uporabi ponovljeni vzorec kulture ali le ena sama tretirana kultura. Rezultate, pridobljene za ponovljene vzorce kultur pri zadevni koncentraciji, je treba navesti ločeno, vendar se lahko za podatkovno analizo združijo (55). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, so ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti je treba koncentracije izbrati tako, da zajemajo območje citotoksičnosti od koncentracije, ki povzroča citotoksičnost, kot je opisano v odstavku 28, do vključno koncentracij, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za zajem celotnega območja citotoksičnosti ali podrobno preučevanje odziva na koncentracijo morda uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in več kot štiri koncentracije, zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavek 70). Uporaba več kot štirih koncentracij je lahko še zlasti pomembna, če se uporabi ena sama kultura.

28. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji pri preskusu MLA prizadevati za od 20- do 10- odstotno relativno skupno rast, pri preskusu TK6 pa za od 20-do 10-odstotno relativno preživetje (odstavek 67).

29. Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Ker se pri preskusih MLA in TK6 uporabljajo suspenzijske kulture, je treba še zlasti paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa. Koristno je lahko tudi, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.

▼M8

30. Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 μl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (57) (58). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (tj. kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo (UVCB)), okoljski ekstrakti itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (59).

Kontrole

31. Za vsak preskusni pogoj je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavek 21), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.

32. Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokažejo zmožnost laboratorija, da odkrije mutagene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, učinkovitost zunanjega sistema presnovne aktivacije (če je ustrezno) in ustrezna zaznava majhnih/pozno nastalih in velikih/zgodaj nastalih mutant *TK*. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge snovi, če je to utemeljeno. Ker so preskusi genske toksičnosti *in vitro* za celice sesalcev dovolj standardizirani za kratkotrajna tretiranja (3–4 ure), ki se izvedejo sočasno s presnovno aktivacijo in brez nje ter z enakim trajanjem tretiranja, je uporaba pozitivnih kontrol lahko omejena na mutagen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (tj. 24 ur brez S9), če se uporablja, uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema, odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi presegla meje, določene za to preskusno metodo (glej odstavek 28).

Preglednica 1

Referenčne snovi, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Snov	Št. CAS
1. Mutageni, aktivni brez presnovne aktivacije		
	Metil metansulfonat	66-27-3
	Mitomicin C	50-07-7
	4-nitrokvinolin-N-oksid	56-57-5
2. Mutageni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciklofosfamid (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetilbenzoantracen	57-97-6
	3-metilholantren	56-49-5

▼M8

POSTOPEK

Tretiranje s preskusno kemikalijo

33. Množeče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije. Čas izpostavljenosti mora biti ustrezno dolg (navadno je ustrezno 3–4 ure). Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (59). Pri preskusu MLA se v primerih, ko kratkotrajno tretiranje da negativne rezultate in informacije kažejo, da je potrebno daljše tretiranje (npr. nukleozidni analogi, slabo topne kemikalije (5) (59)), je treba razmisliti o izvedbi preskusa z daljšim tretiranjem, tj. 24 ur brez S9.

34. Najmanjše število celic, ki se za vsako preskusno kulturo (kontrolno in tretirano) uporabijo v vsaki fazi preskusa, mora temeljiti na pogostnosti spontanih mutant. Splošno vodilo je, da se tretira in pasažira dovolj celic v vsaki preskusni kulturi, da se v vseh fazah preskusa (tretiranje, izražanje fenotipa in selekcija mutant) vzdržuje vsaj 10, v idealnem primeru pa 100 spontanih mutant (56).

35. Pri preskusu MLA je priporočena sprejemljiva pogostnost spontanih mutant med 35–140 × 10^{-6} (različica z agarjem) in 50–170 × 10^{-6} (različica z mikrotitrsko ploščo) (glej preglednico 2). Da se za vsako preskusno kulturo dobi vsaj 10 in v idealnem primeru 100 spontanih mutant, ki preživijo tretiranje, je treba tretirati vsaj 6 × 10^{6} celic. S tretiranjem takega števila celic in vzdrževanjem dovolj celic med izražanjem in kloniranjem za selekcijo mutant se zagotovi zadostno število spontanih mutant (10 ali več) med vsemi fazami poskusa, tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost (kot je izmerjena z 10-odstotno relativno skupno rastjo) (19) (38) (39).

36. Pri preskusu TK6 pogostnost spontanih mutant na splošno znaša med 2 in 10 × 10^{-6}. Da se za vsako kulturo dobi vsaj 10 spontanih mutant, ki preživijo tretiranje, je treba tretirati vsaj 20 × 10^{6} celic. S tretiranjem takega števila celic se zagotovi zadostno število spontanih mutant (10 ali več), in to tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost med tretiranjem (10-odstotno relativno preživetje). Poleg tega je treba v obdobju izražanja kultivirati zadostno število celic in jih nasaditi na ploščo za selekcijo mutant (60).

Čas izražanja fenotipa ter merjenje citotoksičnosti in pogostnosti mutant

37. Ob koncu obdobja tretiranja se celice določen čas kultivirajo, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa na novo induciranih mutant; specifičnih za vsako celično linijo. Pri preskusu MLA obdobje izražanja fenotipa traja 2 dni. Pri preskusu TK6 obdobje izražanja fenotipa traja 3–4 dni. Če se uporabi 24-urno tretiranje, se obdobje izražanja začne po koncu tretiranja.

38. V obdobju izražanja fenotipa se celice preštejejo vsak dan. Pri preskusu MLA se na podlagi dnevnega štetja celic izračuna dnevna rast v suspenziji. Po dvodnevnem obdobju izražanja se celice suspendirajo v gojišču s selektivno snovjo in brez nje, da se določita število mutant (plošče za selekcijo) oziroma učinkovitost tvorbe klonov (plošče za viabilnost). Pri preskusu MLA obstajata dve enako sprejemljivi metodi kloniranja za selekcijo mutant; pri eni se na 96-jamičnih ploščah uporabi mehki agar, pri drugi pa tekoči medij (19) (38) (39). Kloniranje v TK6 se izvede s tekočim medijem in 96-jamičnimi ploščami (16).

▼M8

39. Edina priporočena selektivna snov za mutante *TK* je trifluorotimidin (TFT) (61).

40. Pri preskusu MLA se plošče z agarjem in mikrotitrske plošče preštejejo po 10–12 dneh inkubacije. Pri preskusu TK6 se v kolonijah na mikrotitrskih ploščah po 10–14 dneh preštejejo zgodaj nastale mutante. Da se pridobijo počasi rastoče (pozno nastale) mutante TK6, je treba celice po preštetju zgodaj nastalih mutant znova napojiti z rastnim medijem in TFT ter nato plošče inkubirati še nadaljnjih 7–10 dni (62). Za razpravo v zvezi s štetjem počasi in normalno rastočih mutant *TK* glej odstavka 42 in 44.

41. Ustrezni izračuni za oba preskusa, vključno z obema metodama (z agarjem in mikrotitrsko ploščo), za preskus MLA so v Dodatku 2. Pri metodi MLA z agarjem se kolonije preštejejo, število mutiranih kolonij pa se prilagodi z učinkovitostjo tvorbe klonov, da se izračuna pogostnost mutant. Pri različici preskusov MLA in TK6 z mikrotitrsko ploščo se učinkovitost tvorbe klonov na ploščah za selekcijo in učinkovitost tvorbe klonov določi v skladu s Poissonovo porazdelitvijo (63). Pogostnost mutant se izračuna na podlagi teh dveh učinkovitosti tvorbe klonov.

Opredelitev lastnosti mutirane kolonije

42. Če da preskusna kemikalija pri preskusu MLA pozitiven rezultat (glej odstavka 62 in 63), je treba opredeliti lastnosti kolonij z razvrstitvijo kolonij po velikosti ali rasti pri vsaj eni od preskusnih kultur (običajno najvišja sprejemljiva pozitivna koncentracija) ter pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Če da preskusna kemikalija negativen rezultat (glej odstavek 64), je treba opredeliti lastnosti mutirane kolonije pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Pri metodi preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo so mutante z majhnimi kolonijami opredeljene kot tiste, ki prekrivajo manj kot 25 % premera jamice, mutante z velikimi kolonijami pa kot tiste, ki prekrivajo več kot 25 % premera jamice. Pri metodi z agarjem se za štetje mutiranih kolonij in razvrstitev kolonij po velikosti uporablja avtomatski števec kolonij. Pristopi k razvrščanju kolonij po velikosti so podrobno opisani v virih (19) (38) (40). Opredelitev lastnosti kolonij pri negativnem in pozitivnem kontrolnem vzorcu je potrebna kot dokaz, da se študije izvajajo ustrezno.

43. Za preskusno kemikalijo ni mogoče ugotoviti, da daje negativen rezultat, če mutante z velikimi in majhnimi kolonijami niso ustrezno zaznane v pozitivnem kontrolnem vzorcu. Z opredelitvijo lastnosti kolonij se lahko zagotovijo splošne informacije v zvezi s sposobnostjo preskusne kemikalije, da povzroči točkovne mutacije in/ali kromosomske pojave (odstavek 4).

44. TK6: normalno rastoče in počasi rastoče mutante se razlikujejo po različnem času inkubacije (glej odstavek 40). Na splošno se pri TK6 zgodnje in pozno nastale mutante preštejejo v vseh kulturah, vključno z negativnimi in pozitivnimi kontrolnimi vzorci. Opredelitev lastnosti kolonij pri negativnem in pozitivnem kontrolnem vzorcu je potrebna kot dokaz, da se študije izvajajo ustrezno. Za preskusno kemikalijo ni mogoče šteti, da daje negativen rezultat, če zgodaj nastale in pozno nastale mutante v pozitivnem kontrolnem vzorcu niso ustrezno zaznane. Z opredelitvijo lastnosti kolonij se lahko zagotovijo splošne informacije v zvezi s sposobnostjo preskusne kemikalije, da povzroči točkovne mutacije in/ali kromosomske pojave (odstavek 4).

▼M8

Usposobljenost laboratorija

45. Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi snovmi, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj ena aktivna s presnovno aktivacijo in ena aktivna brez presnovne aktivacije, izbrani med snovmi s seznama v preglednici 1), in različnimi negativnimi kontrolami (vključno z netretiranimi kulturami in različnimi topili/vehikli), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. Ta zahteva ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih 47–50. Pri preskusu MLA morajo biti vrednosti, dobljene za pozitivni in negativni kontrolni vzorec, skladne s priporočili IWGT (glej preglednico 2).

46. Izbor snovi za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1) je treba preiskati s kratkotrajnim in dolgotrajnim tretiranjem (če se uporablja dolgotrajno tretiranje) brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje mutagenih kemikalij, določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije ter dokaže ustreznost pogojev za rast celic med tretiranjem, izražanjem fenotipa in selekcijo mutant ter dokaže ustreznost postopkov štetja. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemikalij, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

47. Laboratorij mora določiti:

— območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter

— območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

48. Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah. Ko se k porazdelitvi kontrol doda več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (64) (65).

49. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali karte „X-črta“ (65)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (66). Nadaljnje podrobnosti in priporočila o tem, kako zbrati in uporabiti podatke iz preteklih preskusov, so navedeni v virih (64).

50. V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pogostnost mutant iz ene kulture ali po možnosti ponovljenih vzorcev kultur, kot je opisano v odstavku 27. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstajata dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 49), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.

▼M8

51. Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba preučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

52. Predstavitev podatkov za preskusa MLA in TK6 mora za tretirane in kontrolne kulture vključevati podatke, potrebne za izračun citotoksičnosti (relativna skupna rast (RTG) oziroma relativno preživetje (RS)) in pogostnosti mutant, kot je opisano v nadaljevanju.

53. Pri preskusu MLA je treba za posamezno kulturo zagotoviti podatke o relativni rasti v suspenziji (RSG), relativni skupni rasti (RTG), učinkovitosti tvorbe klonov ob selekciji mutant in številu mutiranih kolonij (za različico z agarjem) ali številu praznih jamic (za različico z mikrotitrsko ploščo). Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na milijon preživelih celic. Če je odziv pozitiven, je treba navesti pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami (in/ali delež skupne pogostnosti mutant) vsaj za eno koncentracijo preskusne kemikalije (običajno najvišja pozitivna koncentracija) ter negativno in pozitivno kontrolo. V primeru negativnega odziva je treba pogostnost mutant z majhnimi in velikimi kolonijami navesti za negativno in pozitivno kontrolo.

54. Pri preskusu TK6 je treba za posamezno kulturo zagotoviti podatke o relativnem preživetju (RS), učinkovitosti tvorbe klonov ob selekciji mutant in številu praznih jamic za zgodaj nastale in pozno nastale mutante. Pogostnost mutant je treba izrazi kot število mutiranih celic na število preživelih celic, vključevati pa mora skupno pogostnost mutant ter pogostnost mutant (in/ali delež skupne pogostnosti mutant) zgodaj nastalih in pozno nastalih mutant.

Merila za sprejemljivost

55. Pri preskusih MLA in TK6 morajo biti izpolnjena naslednja merila, preden se določijo splošni rezultati za posamezno preskusno kemikalijo:

— izvedena sta bila dva preskusna pogoja (kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje – glej odstavek 33), razen če so bili pri enem dobljeni pozitivni rezultati;

— analizirati mora biti mogoče ustrezno število celic in koncentracij (glej odstavke 27 in od 34 do 36);

— merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih od 28 do 30.

Merila za sprejemljivost negativnih in pozitivnih kontrol

56. Analiza obsežne količine podatkov o MLA, ki jo je opravila strokovna delovna skupina IWGT za MLA, je privedla do mednarodnega soglasja o posebnih merilih za sprejemljivost preskusa MLA (1) (2) (3) (4) (5). Zato ta preskusna metoda zagotavlja posebna priporočila za določanje sprejemljivosti negativnih in pozitivnih kontrol ter za ocenjevanje rezultatov posameznih snovi pri preskusu MLA. Preskus TK6 ima veliko manjšo zbirko podatkov in ga delovna skupina ni ocenila.

▼M8

57. Pri preskusu MLA je treba za vsak poskus oceniti, ali netretirana kontrola/kontrola s topilom izpolnjuje merila za sprejemljivost delovne skupine IWGT za MLA ((4) in preglednica 2 v nadaljevanju) v zvezi s: (1) pogostnostjo mutant (upoštevati je treba, da so pogostnosti mutant, sprejemljive po IWGT, različne za različici preskusa MLA z agarjem in mikrotitrsko ploščo), (2) učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant in (3) rastjo v suspenziji za kontrolo s topilom (za formule glej Dodatek 2).

Preglednica 2

Merila za sprejemljivost preskusa MLA

Parameter	Metoda z mehkim agarjem	Metoda z mikrotitrsko ploščo
Pogostnost mutant	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Učinkovitost tvorbe klonov	65–120 %	65–120 %
Rast v suspenziji	8–32-kratna (3–4-urno tretiranje) 32–80-kratna (24-urno tretiranje, če se izvede)	8–32-kratna (3–4-urno tretiranje) 32–80-kratna (24-urno tretiranje, če se izvede)

58. Pri preskusu MLA je treba za vsak preskus oceniti tudi, ali pozitivne kontrole izpolnjujejo vsaj eno od naslednjih dveh meril za sprejemljivost, ki ju je razvila delovna skupina IWGT:

— pri pozitivni kontroli je treba dokazati absolutno povečanje skupne pogostnosti mutant, tj. povečanje nad spontano pogostnost mutant v ozadju (inducirana pogostnost mutant), ki znaša vsaj 300 × 10^{-6}. Vsaj 40 % inducirane pogostnosti mutant se mora kazati v pogostnosti mutant v majhni koloniji;

— pozitivna kontrola ima povečano pogostnost mutant v majhni koloniji, ki znaša vsaj 150 × 10^{-6} nad tisto v sočasni netretirani kontroli/kontroli s topilom (inducirana pogostnost mutant v majhni koloniji znaša 150 × 10^{-6}).

59. Preskus TK6 je sprejemljiv, če se podatki o sočasni negativni kontroli štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavkih 48 in 49. Poleg tega morajo sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 32) povzročiti odzive, ki so skladni z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.

60. Pri obeh preskusih mora biti zgornja meja citotoksičnosti, opažene v pozitivni kontrolni kulturi, enaka kot pri poskusnih kulturah. To pomeni, da relativna skupna rast (RTG)/relativno preživetje (RS) ne sme biti manjše od 10 %. Zadostuje, da se uporabi ena koncentracija (ali ena od koncentracij pozitivnih kontrolnih kultur, če se uporabi več kot ena koncentracija) za dokaz, da so izpolnjena merila za sprejemljivost pozitivne kontrole. Dalje, pogostnost mutant v pozitivni kontroli mora biti znotraj sprejemljivega območja, določenega za laboratorij.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

61. Za preskus MLA je pomembno delo o biološki pomembnosti in merilih za pozitivni odziv opravila strokovna delovna skupina IWGT za limfom miši (4). Zato ta preskusna metoda zagotavlja specifična priporočila za razlago rezultatov preskusne kemikalije pri preskusu MLA (glej odstavke od 62 do

▼M8

64). Preskus TK6 ima veliko manjšo zbirko podatkov in ga delovna skupina ni ocenila. Zato so priporočila za razlago podatkov za preskus TK6 splošnejša (glej odstavka 65 in 66). Za oba preskusa veljajo dodatna priporočila (glej odstavke od 67 do 71).

MLA

62. Priporočen je pristop za opredelitev pozitivnih in negativnih odzivov, ki zagotavlja, da je povečana pogostnost mutant biološko pomembna. Namesto statistične analize, ki se običajno uporablja pri drugih preskusih, temelji na uporabi vnaprej določene inducirane pogostnosti mutant (tj. povečanje pogostnosti mutant nad sočasno kontrolo), imenovane splošni ocenjevalni faktor (Global Evaluation Factor (GEF)), ki temelji na analizi porazdelitve podatkov o pogostnosti mutant pri negativni kontroli, pridobljenih od sodelujočih laboratorijev (4). Pri različici preskusa MLA z agarjem GEF znaša 90×10^{-6}, pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo pa GEF znaša 126×10^{-6}.

63. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33) povečanje pogostnosti mutant nad hkratno ozadje presega GEF in je povečanje povezano s koncentracijo (npr. z uporabo trendnostnega testa). Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroči nastanek mutacij v tem preskusnem sistemu.

64. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33) ni odziva, povezanega s koncentracijo, ali pa če v primeru povečanja pogostnosti mutant ta ne presega GEF. Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka mutacij v tem preskusnem sistemu.

TK6

65. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33):

— pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom (glej odstavek 33);

— pojavijo rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 48).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek mutacij v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (66) (67).

66. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33):

— pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;

— ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

▼M8

— vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 48).

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka mutacij v tem preskusnem sistemu.

Za preskusa MLA in TK6:

67. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati za od 20- do 10-odstotno relativno skupno rast (RTG)/relativno preživetje (RS). Enotno stališče je, da je potrebna pazljivost pri razlagi pozitivnih rezultatov, ki znašajo samo med 20 in 10 % relativne skupne rasti (RTG)/relativnega preživetja (RS), rezultat pa se ne bi štel za pozitiven, če bi se povečanje pogostnosti mutant pojavilo samo pri 10-odstotni relativni skupni rasti/relativnim preživetjem ali pod tem pragom (če je ocenjeno) (2) (59).

68. V nekaterih okoliščinah so lahko dodatne informacije v pomoč pri določitvi, da preskusna kemikalija ni mutagena, če ni kulture, pri kateri bi vrednost relativne skupne rasti (RTG) znašala 10–20 % relativne skupne rasti/relativnega preživetja. Ti primeri so predstavljeni v nadaljevanju: (1) ni dokazov o mutagenosti (npr. ni odziva na odmerek, ni pogostnosti mutant nad tistimi pri sočasni negativni kontroli ali razponi pri preteklih preskusih v ozadju itd.) v nizu podatkovnih točk znotraj od 100- do 20-odstotne relativne skupne rasti/relativnega preživetja, obstaja pa tudi vsaj ena podatkovna točka med 20- in 25-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem; (2) ni dokazov o mutagenosti (npr. ni odziva na odmerek, ni pogostnosti mutant nad tistimi pri sočasni negativni kontroli ali razponi pri preteklih preskusih v ozadju itd.) v nizu podatkovnih točk med 100- in 25-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem, obstaja pa tudi negativna podatkovna točka rahlo pod 10-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem. V obeh teh primerih je mogoče sklepati, da je preskusna kemikalija negativna.

69. Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

70. Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, in/ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Ponovitev poskusa je lahko koristna, tako da se po možnosti uporabijo spremenjeni poskusni pogoji (npr. razmik med koncentracijami za povečanje verjetnosti, da bodo dosežene podatkovne točke v razponu od 10- do 20-odstotne relativne skupne rasti/relativnega preživetja, z uporabo drugih pogojev za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9) in trajanja tretiranja).

71. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih. Zato je treba zaključiti, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen (kar pomeni, da je enako verjetno pozitiven ali negativen).

POROČILO O PRESKUSU

72. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;

▼M8

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila;

— delež topila v končnem gojišču.

Celice:

za laboratorijske izvorne kulture:

— vrsta in izvor celic ter pretekli rezultati v preskuševalnem laboratoriju;

— lastnosti kariotipa in/ali modalno število kromosomov;

— metode vzdrževanja celičnih kultur;

— odsotnost mikoplazem;

— podvojitveni čas celic.

Preskusni pogoji:

— razlogi za izbiro koncentracij in števila celičnih kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;

— sestava gojišča, koncentracija CO_2, stopnja vlažnosti;

— koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v µg ali mg/ml ali mM gojišča);

— koncentracija (in/ali količina) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;

— temperatura inkubacije;

— čas inkubacije;

— trajanje tretiranja;

— gostota celic med tretiranjem;

▼**M8**

— vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali količina zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9);

— snovi pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;

— dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno);

— identiteta selektivne snovi in njena koncentracija;

— pri preskusu MLA je treba navesti uporabljeno različico (z agarjem ali mikrotitrsko ploščo);

— merila za sprejemljivost preskusov;

— uporabljene metode za določanje števila viabilnih in mutiranih celic;

— uporabljene metode za merjenje citotoksičnosti;

— vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;

— trajanje inkubacije po nasaditvi na ploščo;

— opredelitev, katera velikost in tip kolonij se upoštevata (vključno z merili za „majhne“ in „velike“ kolonije, če je to primerno);

— merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;

— uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti, če se opravi, in obarjanja, če je ustrezno.

Rezultati:

— število tretiranih celic in število celic, kultiviranih na novem gojišču, za vsako kulturo;

— parametri toksičnosti (relativna skupna rast za MLA in relativno preživetje za TK6);

— znaki obarjanja in čas odkritja;

— število celic, nasajenih v selektivno in neselektivno gojišče;

— število kolonij v neselektivnem gojišču in število odpornih kolonij v selektivnem gojišču ter s tem povezani pogostnosti mutant;

— razvrščanje kolonij po velikosti pri negativni in pozitivni kontroli, ter če je preskusna kemikalija pozitivna, vsaj ena koncentracija in s tem povezane pogostnosti mutant;

— razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

— podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);

— podatki o pretekli negativni (topilo) in pozitivni kontroli (koncentracije in topila) z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni; število preskusov, na katerih temeljijo pretekle kontrole;

▼**M8**

— statistične analize (za posamezne kulture in združene ponovljene vzorce, če je ustrezno) in p-vrednosti, če obstajajo; in pri MLA ocena GEF.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. (poročevalec), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H., in Stankowski, L. F., Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185–190.

(2) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H., in Stankowski, L. F., Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (april 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292–299.

(3) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A., Wakuri, S., in Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127–140.

(4) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A. K., Van Goethem, F., Wakuri, S., in Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1–5.

(5) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D. A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A. K., in Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36–40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

(7) Fellows, M. D., Luker, T., Cooper, A., in O'Donovan, M. R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21–28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T., in Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1–2): 101–114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J. R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N., in Moore, M. M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96–105.

(10) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A., in Hozier, J. C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51–55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B., in Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169–181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D., in Moore, M. M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237–242.

(13) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T., in Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161–174.

(14) Liber, H. L., Call, K. M., in Little, J. B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143–153.

(15) Li, C. Y., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77–87.

(16) Honma, M., Hayashi, M., in Sofuni, T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89–98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J. B., Sofuni, T., in Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203–14.

(18) Amundson, S. A., in Liber, H. L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89–95.

(19) Schisler, M. R., Moore, M. M., in Gollapudi, B. B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (ur.), Springer Protocols, Humana Press: 27–50.

(20) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., in Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177–183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., in Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439–452.

(22) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879–886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., in Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297–305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Jr., Brusick, D., Ashby, J., in Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147–204.

(25) Wang, J., Heflich, R. H., in Moore, M. M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185–190.

(26) Fischer, G. A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673–680.

(27) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G., in Brown, M. M. M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61–108.

(28) Sawyer, J., Moore, M. M., Clive, D., in Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243–253.

(29) Sawyer, J. R., Moore, M. M., in Hozier, J. C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181–193.

(30) Sawyer, J. R., Binz, R. L., Wang, J., in Moore, M. M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127–131.

(31) Fellows, M. D., McDermott, A., Clare, K. R., Doherty, A., in Aardema, M. J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35–42.

(32) Storer, R. D., Jraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T. L., in DeLuca, J. G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157–165.

(33) Clark, L. S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S. H., in Moore, M. M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263–268.

(34) Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W., in Thilly, W. G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma, M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162–176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T., in Liber, H. L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12–15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., Donovan, M. O., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., in Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rokopis v pripravi).

(38) Lloyd, M., in Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ur. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35–54.

(39) Mei, N., Guo, X., in Moore, M. M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. V: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan, Z., in Caldwell (ur.) , 2. izdaja, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber, H. L., in Thilly, W. G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467–485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., in Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261–287.

(42) Moore, M. M., in Howard, B. E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287–294.

(43) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347–364.

(44) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173–215.

(45) Natarajan, A. T., Tates, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M., in De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83–90.

(46) Matsuoka, A., Hayashi, M., in Ishidate, M., Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277–290.

(47) Ong, T. M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol*., 4 (1): 55–65.

(48) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175–177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. V: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F. J., *et al.* (ur.), Elsevier, North-Holland, str. 85–88.

▼**M8**

(50) Galloway, S. M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241–261.

(51) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R., in Galloway, S. M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51–59.

(52) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP).

(53) Krahn, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. V: Genotoxic Effects of Airborne Agents, Tice, R. R., Costa, D. L., in Schaich, K. M. (ur.) New York, Plenum, str. 91–103.

(54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795–801.

(55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S., in Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122–130.

(56) Arlett, C. F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J. (ur.), CambridgeUniversity Press, str. 66–101.

(57) Morita, T., Honma, M., in Morikawa, K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32–56.

(58) Brookmire, L., Chen, J. J., in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36–43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Na voljo na: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma, M., in Hayashi, M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373–384.

(61) Moore-Brown, M. M., Clive, D., Howard, B. E., Batson, A. G., in Johnson, K. O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363–378.

(62) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9–17.

(63) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L., in Rand, W. M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1–8.

(64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87–90.

▼**M8**

(65) Ryan, T. P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York, 2. izdaja.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 199), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(67) Fleiss, J. L., Levin, B., in Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3. izdaja, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Anevgen: vsaka kemikalija ali proces, na podlagi katerega pride do anevploidije v celicah ali organizmih zaradi reagiranja z elementi mitotskega in mejoznega cikla delitve celic.

Anevploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Mutageni substitucije baznih parov: kemikalije, ki povzročijo zamenjavo baznih parov v DNK.

Kemikalija: snov ali zmes.

Učinkovitost tvorbe klonov: delež celic, nasajenih na ploščo pri nizki gostoti in sposobnih zrasti v kolonijo, ki jo je mogoče prešteti.

Klastogen: vsaka kemikalija ali proces, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali organizmih.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v tej preskusni metodi, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne skupne rasti ali relativnega preživetja pri preskusu MLA oziroma preskusu TK6.

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja ali funkcije kodiranega proteina.

Mutageni premika bralnega okvira: kemikalije, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNK.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNK ali kromosomov, vključno s prelomi DNK, adukti, prerazporeditvami, mutacijami, aberacijami kromosomov in anevploidijo. Vsi genotoksični učinki ne povzročijo nastanka mutacij ali trajnih kromosomskih poškodb.

Mitotična rekombinacija: med mitozo rekombinacija med homolognimi kromatidi, ki lahko povzroči indukcijo prelomov dvojne vijačnice DNK ali izgubo heterozigotnosti.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih celic, deljeno s številom viabilnih celic.

Čas izražanja fenotipa: čas po tretiranju, v katerem je genetsko spreminjanje fiksno znotraj genoma, vsi morebitni predhodno obstoječi genski produkti pa se odstranijo, tako da se spremeni fenotipska lastnost.

Relativno preživetje: relativno preživetje se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem, pri preskusu TK6. Pomeni relativno učinkovitost tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju celic, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativni kontroli.

▼M8

Relativna rast v suspenziji: pri preskusu MLA relativna skupna dvodnevna rast preskusne kulture v suspenziji v primerjavi s skupno dvodnevno rastjo negativne kontrole/kontrole s topilom v suspenziji (Clive in Spector, 1975). Relativna rast v suspenziji mora vključevati relativno rast preskusne kulture v primerjavi z negativno kontrolo/kontrolo s topilom v obdobju tretiranja.

Relativna skupna rast: relativna skupna rast se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem, pri preskusu MLA. Je merilo relativne (glede na kontrolo z vehiklom) rasti preskusnih kultur med fazami kloniranja v preskusu, ki obsegajo tretiranje, dvodnevno izražanje in selekcijo mutant. Relativna rast vsake preskusne kulture v suspenziji se pomnoži z relativno učinkovitostjo tvorbe klonov pri preskusni kulturi ob selekciji mutant in izrazi glede na učinkovitost tvorbe klonov pri negativni kontroli/kontroli s topilom (Clive in Spector, 1975).

Frakcije S9, pripravljene iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica frakcije S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Rast v suspenziji: stopnja povečanja števila celic med fazama tretiranja in izražanja pri preskusu MLA. Rast v suspenziji se izračuna tako, da se pri kratkotrajnem (3- ali 4-urnem) tretiranju stopnja povečanja prvega dne pomnoži s stopnjo povečanja drugega dne. Če se uporabi 24-urno tretiranje, je rast v suspenziji stopnja povečanja med 24-urnim tretiranjem, pomnožena s stopnjami povečanja prvi in drugi dan izražanja.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirane kontrole: netretirane kontrole so kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

▼M8

Dodatek 2

FORMULE

Citotoksičnost

Za obe različici preskusa MLA (z agarjem in mikrotitrsko ploščo)

Citotoksičnost je opredeljena kot relativna skupna rast (RTG – Relative Total Growth), ki vključuje relativno rast v suspenziji (RSG – Relative Suspension Growth) v dvodnevnem obdobju izražanja in relativno učinkovitost tvorbe klonov (RCE – Relative Cloning Efficiency), dobljeno ob selekciji mutant. RTG, RSG in RCE se izrazijo kot deleži.

Izračun RSG: Rast v suspenziji ena (SG_1) je hitrost rasti med dnevom 0 in dnevom 1 (koncentracija celic na dan 1/koncentracija celic na dan 0), rast v suspenziji dve (SG_2) pa je hitrost rasti med dnevom 1 in dnevom 2 (koncentracija celic na dan 2/koncentracija celic na dan 1). RSG je skupna SG ($SG_1 \times SG_2$) za tretirano kulturo v primerjavi z netretirano kontrolo/kontrolo s topilom. To je: $RSG = [SG_{1(preskus)} \text{ x } SG_{2(preskus)}]/[SG_{1(kontrola)} \text{ x } SG_{2(kontrola)}]$ SG_1 je treba izračunati iz začetne koncentracije celic, ki se uporabi ob začetku tretiranja celic. To pomeni morebitno razliko v citotoksičnosti, ki se v celičnih kulturah pojavi med tretiranjem celic.

RCE (Relative Cloning Efficiency) je relativna učinkovitost tvorbe klonov v preskusni kulturi v primerjavi z relativno učinkovitostjo tvorbe klonov v netretirani kontroli/kontroli s topilom, dobljeno ob selekciji mutant.

Relativna skupna rast (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Relativno preživetje (RS – Relative Survival):

Citotoksičnost se oceni z relativnim preživetjem, tj. učinkovitostjo tvorbe klonov (CE) celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje). Prilagoditev zaradi izgube celic med tretiranjem se lahko izračuna kot:

$$\text{Prilagojena CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{število celic na koncu tretiranja}}{\textit{število celic na začetku tretiranja}}$$

RS za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$RS = \frac{\textit{prilagojena CE v tretirani kulturi}}{\textit{prilagojena CE v kontroli s topilom}} \times 100$$

Pogostnost mutant pri preskusih MLA in TK6

Pogostnost mutant (MF – Mutant Frequency) je učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču (CE_M), prilagojena z učinkovitostjo tvorbe klonov v neselektivnem gojišču ob selekciji mutant (CE_V). Torej, $MF = CE_M/CE_V$. Izračun teh dveh učinkovitosti tvorbe klonov je v nadaljevanju opisan za metodo kloniranja z agarjem in z mikrotitrsko ploščo.

▼**M8**

***Različica preskusa MLA z agarjem**:* pri različici preskusa MLA z agarjem se število kolonij na plošči za selekcijo mutant (C_M) in število kolonij na neselektivni plošči ali plošči za učinkovitost tvorbe klonov (štetje viabilnih celic) (C_V) dobita z neposrednim štetjem klonov. Ko se nasadi 600 celic za učinkovitost tvorbe klonov (CE) na plošče za selekcijo mutant (CE_M) in neselektivne plošče ali plošče za učinkovitost tvorbe klonov (štetje viabilnih) (CE_V) in se za selekcijo mutant uporabi 3×10^6 celic,

$CE_M = C_M/(3 \times 10^6) = (C_M/3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V/600$

Različica preskusov MLA in TK6 z mikrotitrsko ploščo: pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo se C_M in C_V določita kot zmnožek skupnega števila mikrojamic (TW) in verjetnega števila kolonij na jamico (P) na mikrotitrskih ploščah.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Od ničte Poissonove porazdelitve (Furth et al., 1981) je P podan kot

$P = - \ln (EW/TW)$

Pri čemer je EW število praznih jamic, TW pa število vseh jamic. Zato

$CE_M = C_M/T_M = (P_M \times TW_M)/T_M$

$CE_V = C_V/T_V = (P_V \times TW_V)/T_V$

Pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo se enako izračunajo pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami, tako da se uporabi ustrezno število praznih jamic za majhne in velike kolonije.

Pri preskusu TK6 pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami temeljijo na zgodaj nastalih in pozno nastalih mutantah.

▼M8

B.68 **IN VITRO PRESKUSNA METODA KRATKOTRAJNE IZPOSTAVLJENOSTI ZA OPREDELITEV (i) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN (ii) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 491 (2017). Preskusna metoda kratkotrajne izpostavljenosti (Short Time Exposure – STE) je metoda *in vitro*, ki se lahko uporabi v določenih okoliščinah in s posebnimi omejitvami za razvrstitev glede na nevarnost in označevanje kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči, in tistih, ki jih ni treba razvrstiti glede na hude poškodbe oči ali draženje oči, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]).

2. Že vrsto let se potencialna nevarnost kemikalij za oči ocenjuje predvsem z uporabo preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (preskusna metoda B.5 (8), ki je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 405). Na splošno velja, da *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih v bližnji prihodnosti ne bo mogoče v celoti nadomestiti z enim samim alternativnim preskusom *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon hudih poškodb oči/učinkov draženja oči za različne kemijske razrede. Strateške kombinacije alternativnih preskusnih metod, uporabljenih pri (večstopenjski) strategiji preskušanja, pa bi morda lahko v celoti nadomestile preskus draženja oči na kuncih (2). Pristop od zgoraj navzdol je zasnovan za preskušanje kemikalij, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja ali da bo povzročila hude poškodbe oči. Nasprotno pa je pristop od spodaj navzgor zasnovan za preskušanje kemikalij, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti. Čeprav se preskusna metoda STE ne obravnava kot celovit nadomestek za *in vivo* preskus draženja oči na kuncih, je primerna za uporabo kot del večstopenjske strategije preskušanja za regulativno razvrščanje in označevanje, kot je pristop od zgoraj navzdol/od spodaj navzgor, da se brez dodatnega preskušanja opredelijo (i) kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP), in (ii) kemikalije (pri čemer so izključene zelo hlapne snovi in vse trdne kemikalije, razen površinsko aktivnih snovi), ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP) (1)(2). Vendar bi bilo treba kemikalijo, za katero se s preskusno metodo STE ne napove, da povzroča hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) niti da spada med snovi brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP (ne povzroča niti hudih poškodb oči niti draženja oči), dodatno preskusiti, da se določi končna razvrstitev. Poleg tega se je treba pred uporabo pristopa od spodaj navzgor pri preskusni metodi STE v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso GHS ZN/uredba CLP, posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi. Izbiro najustreznejše preskusne metode in uporabo te preskusne metode je treba obravnavati v okviru smernice OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi s hudimi poškodbami oči in draženjem oči (14).

3. V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da pri preskusni metodi kratke izpostavljenosti povzroči citotoksičnost. Citotoksični učinek kemikalij na epitelne celice roženice je pomemben način delovanja, ki povzroča poškodbe roženičnega epitelija in draženje oči. Viabilnost celic se pri preskusni metodi STE oceni s kvantitativnim merjenjem – po ekstrakciji iz celic – soli modrega formazana, ki jo žive celice proizvedejo z

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

▼M8

encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), znanega tudi kot tiazolil modro tetrazol bromid (3). Dobljena viabilnost celic se primerja s kontrolo s topilom (relativna viabilnost) in uporabi za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči. Preskusna kemikalija se razvrsti v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP, če 5-odstotna in 0,05-odstotna koncentracija povzročita največ (≤) 70-odstotno viabilnost celic. Nasprotno pa se za kemikalijo predvideva, da je brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP, če 5-odstotna in 0,05-odstotna koncentracija povzročita več kot (>) 70-odstotno viabilnost celic.

4. Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode STE za preskušanje snovi in/ali zmesi. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

5. Ta preskusna metoda temelji na protokolu, ki ga je razvila družba Kao Corporation (4) in je bil predmet dveh različnih validacijskih študij: eno je izvedel validacijski odbor japonske družbe za alternative poskusom na živalih (JSAAE) (5), drugo pa japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (6). Medsebojni strokovni pregled sta izvedla NICEATM/ICCVAM na podlagi poročil o validacijskih študijah in dokumentov o pregledu ozadja v zvezi s preskusno metodo (7).

6. Ko je bila preskusna metoda STE uporabljena za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) (1), so podatki, pridobljeni za 125 kemikalij (med katerimi so bile snovi in zmesi), pokazali 83-odstotno splošno točnost (104/125), 1-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (1/86) in 51-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (20/39) v primerjavi z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih (7). Delež lažno negativnih rezultatov v tem primeru ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, ki povzročajo viabilnost celic ≤ 70 % pri 5-odstotni koncentraciji in > 70 % pri 0,05-odstotni koncentraciji, naknadno preskusijo še z drugimi ustrezno validiranimi preskusnimi metodami *in vitro* ali – kot zadnja možnost – z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve ter v skladu s trenutno priporočeno strategijo zaporednega preskušanja in pristopi, ki temeljijo na zanesljivosti dokazov (1) (8). V glavnem so bile preskušene snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja tudi omejena količina podatkov o preskušanju zmesi. Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden pa se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Preskusna metoda STE ni pokazala drugih posebnih pomanjkljivosti, ko je bila uporabljena za opredelitev preskusnih kemikalij kot kemikalij kategorije 1 po GHS ZN/uredbi CLP. Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za preskusne kemikalije, pri čemer je treba viabilnost celic ≤ 70 % pri 5-odstotni in tudi 0,05-odstotni koncentraciji sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči in ga je treba brez nadaljnjega preskušanja razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

▼**M8**

7. Ko je bila preskusna metoda STE uporabljena za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči (tj. brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), so podatki, pridobljeni za 130 kemikalij (med katerimi so bile snovi in zmesi), pokazali 85-odstotno splošno točnost (110/130), 12-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (9/73) in 19-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (11/57) v primerjavi z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih (7). Če se iz podatkovnega niza izključijo zelo hlapne snovi in trdne snovi, razen površinsko aktivnih, se splošna točnost izboljša na 90 % (92/102), delež lažno negativnih rezultatov na 2 % (1/54), delež lažno pozitivnih rezultatov pa na 19 % (9/48) (7). Posledično sta potencialni pomanjkljivosti preskusne metode STE, če se uporabi za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), visoka lažno negativna deleža za (i) zelo hlapne snovi s parnim tlakom nad 6 kPa ter (ii) trdne kemikalije (snovi in zmesi), ki niso površinsko aktivne snovi, in zmesi, ki jih sestavljajo samo površinsko aktivne snovi. Take kemikalije so izključene iz področja uporabe preskusne metode STE (7).

8. Poleg kemikalij, navedenih v odstavkih 6 in 7, podatkovni niz, ustvarjen s preskusno metodo STE, vsebuje tudi interne podatke o 40 zmeseh, ki so v primerjavi z Draizovim preskusom draženja oči *in vivo* pokazali 88-odstotno točnost (35/40), 50-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (5/10) in 0-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (0/30) za napovedovanje zmesi, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistema za razvrščanje po GHS ZN/uredbi CLP (9). Preskusna metoda STE se torej lahko uporabi za opredelitev zmesi kot zmesi brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP z uporabo pristopa od spodaj navzgor, razen za trdne zmesi, ki jih ne sestavljajo samo površinsko aktivne snovi, kot razširitev njene omejitve na trdne snovi. Poleg tega je treba zmesi, ki vsebujejo snovi s parnim tlakom nad 6 kPa, ocenjevati pazljivo, da se preprečijo morebitne razvrstitve v prenizko kategorijo, in jih utemeljiti za vsak primer posebej.

9. Preskusna metoda STE se ne more uporabiti za opredelitev preskusnih kemikalij kot kemikalij kategorije 2 po GHS ZN/uredbi CLP, kategorije 2A po GHS ZN (draženje oči) ali 2B (blažje draženje oči), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN/uredbi CLP razvrščenih v prenizko kategorijo, in sicer v kategorijo 2, 2A ali 2B, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorijo 2, 2A ali 2B (7). Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrezno metodo.

10. Preskusna metoda STE je primerna za preskusne kemikalije, ki se raztopijo ali vsaj 5 minut enakomerno suspendirajo v fiziološki raztopini, 5-odstotnem dimetil sulfoksidu (DMSO) v fiziološki raztopini ali mineralnem olju. Po drugi strani ni primerna za preskusne kemikalije, ki niso topne ali jih ni mogoče vsaj 5 minut enakomerno suspendirati v fiziološki raztopini, 5-odstotnem DMSO v fiziološki raztopini ali mineralnem olju. Uporaba mineralnega olja pri preskusni metodi STE je mogoča zaradi kratkotrajne izpostavljenosti. Zato je preskusna metoda STE primerna za napovedovanje potencialne nevarnosti v vodi netopnih preskusnih kemikalij (npr. dolgoverižnih maščobnih alkoholov ali ketonov) za oči, če se mešajo z vsaj enim od treh zgoraj predlaganih topil (4).

▼M8

11. Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša ([1]), in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode STE za preskušanje snovi in/ali zmesi.

NAČELO PRESKUSA

12. Preskusna metoda STE je preskus *in vitro* na podlagi citotoksičnosti, ki se izvede na konfluentnem monosloju celic roženice kunca Statens Seruminstitut (SIRC), kultiviranih na 96-jamični polikarbonski mikrotitrski plošči (4). Po petminutni izpostavljenosti preskusni kemikaliji se citotoksičnost kvantitativno izmeri kot relativna viabilnost celic SIRC z uporabo analize MTT (4). Zmanjšana viabilnost celic se lahko uporabi za napoved potencialnih škodljivih učinkov, ki povzročajo očesne poškodbe.

13. V skladu s poročili se 80 % raztopine, nakapane v oko kunca, izloči skozi mešiček veznice v treh do štirih minutah, medtem ko se več kot 80 % raztopine, nakapane v človeško oko, izloči v eni do dveh minutah (10). Preskusna metoda STE se poskuša približati tem časom izpostavljenosti in uporablja citotoksičnost kot končno točko za oceno poškodovanosti celic SIRC po petminutni izpostavljenosti preskusni kemikaliji.

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

14. Pred redno uporabo preskusne metode STE, opisane v tej preskusni metodi, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno razvrstijo 11 snovi, priporočenih v preglednici 1. Te snovi so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri hudih poškodbah oči ali draženju oči, temeljijo pa na rezultatih *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (TG 405) in sistemu za razvrščanje po GHS ZN/uredbi CLP (1). Druga merila za izbiro so vključevala razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusno metodo STE (3). V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro*, če se uporabijo enaka merila, kot so opisana tukaj.

Preglednica 1

Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	Kat. *in vivo* po GHS ZN/uredbi CLP ([2])	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
Benzalkonijev klorid (10 %, vodni)	8001-54-5	onijska spojina	tekoče	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	eter	tekoče	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1

([1]) Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju sprejet dogovor, da bi bilo zdaj treba v novih in posodobljenih preskusnih metodah pojem „preskusna kemikalija“, ki opisuje, kaj se preskuša, uporabljati dosledneje, kjer je to mogoče.

▼**M8**

Snov	Št. CAS	Kemijski razred (1)	Agregatno stanje	Kat. *in vivo* po GHS ZN/uredbi CLP (2)	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
Kislo rdeče 92	18472-87-2	heterociklična spojina; bromova spojina; klorova spojina;	trdno	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Natrijev hidroksid	1310-73-2	baza; anorganska kemikalija	trdno	kategorija 1 (3)	fiziološka raztopina	kategorija 1
Butirolakton	96-48-0	lakton; heterociklična spojina	tekoče	kategorija 2A (kategorija 2 po uredbi CLP)	fiziološka raztopina	napoved ni mogoča
1-oktanol	111-87-5	alkohol	tekoče	Kategorija 2A/B (4)(kategorija 2 po uredbi CLP)	mineralno olje	napoved ni mogoča
Ciklopentanol	96-41-3	alkohol; ogljikovodik, ciklični	tekoče	Kategorija 2A/B (5) (kategorija 2 po uredbi CLP)	fiziološka raztopina	napoved ni mogoča
2-etoksietil acetat	111-15-9	alkohol; eter	tekoče	brez kategorije	fiziološka raztopina	brez kategorije
Dodekan	112-40-3	ogljikovodik, aciklični	tekoče	brez kategorije	mineralno olje	brez kategorije
Metil izobutil keton	108-10-1	keton	tekoče	brez kategorije	mineralno olje	brez kategorije

▼M8

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ([1])	Agregatno stanje	Kat. *in vivo* po GHS ZN/uredbi CLP ([2])	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
1,1-dimetilgvanidin sulfat	598-65-2	amidin; žveplova spojina	trdno	brez kategorije	fiziološka raztopina	brez kategorije

([1]) Kemijski razredi so bili dodeljeni na podlagi informacij iz prejšnjih objav centra NICEATM, če te niso bile na voljo, pa na podlagi sistema za razvrščanje MeSH® (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (prek ChemIDplus® (National Library of Medicine), na voljo na http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) in strukturnih določitev, ki jih je opravil center NICEATM.

([2]) Na podlagi rezultatov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (OECD TG 405) in z uporabo GHS ZN/uredbe CLP (1).

([3]) Razvrstitev v kategorijo 1 temelji na potencialu jedkosti za kožo, ki ga ima 100-odstotni natrijev hidroksid (v OECD TG 435 uvrščen na seznam kemikalij za preverjanje usposobljenosti s potencialom jedkosti za kožo), in merilu za kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP (1).

([4]) Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer dve od šestih oziroma štiri od šestih živali, ki imajo sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. Podatkovni niz *in vivo* je vključeval dve študiji s po tremi živalmi. V eni študiji sta dve od treh živali pokazali učinke sedmi dan, tako da je bila upravičena razvrstitev v kategorijo 2A (11), medtem ko so se v drugi študiji vse končne točke pri vseh treh živalih do sedmega dne popravile in so dosegle vrednost nič, zato je bila upravičena razvrstitev v kategorijo 2B (12).

([5]) Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice in rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (sedmi dan) dosegla vrednost 1 in rdečina veznice vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla 14. dan (11).

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

POSTOPEK

Priprava celičnega monosloja

15. Za izvedbo preskusne metode STE je treba uporabiti celično linijo roženice kunca, SIRC. Priporočljivo je, da se celice SIRC pridobijo iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection CCL60.

16. Celice SIRC se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO_2 v steklenički za gojenje celičnih kultur, ki vsebuje gojišče z Eagleovim minimalnim osnovnim gojiščem (MEM), dopolnjeno z 10-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 enotami/ml penicilina in 50–100 µg/ml streptomicina. Celice, ki v steklenički za gojenje postanejo konfluentne, je treba s celičnim strgalom ali brez njega ločiti z raztopino tripsin-etilendiamintetraocetne kisline. Celice se najprej namnožijo (npr. 2 do 3 pasaže) v steklenički za gojenje, nato pa uporabijo za rutinsko preskušanje, in sicer do največ 25 pasaž po odtajanju.

17. Celice, ki so na voljo za uporabo pri preskusu STE, se nato pripravijo z ustrezno gostoto in nasadijo na 96-jamične plošče. Priporočena gostota nasaditve celic je $6{,}0 \times 10^3$ celic na jamico, če se celice uporabijo štiri dni po nasaditvi, ali $3{,}0 \times 10^3$ celic na jamico, če se celice uporabijo pet dni po nasaditvi, pri čemer količina kulture znaša 200 µl. Celice, ki se uporabijo pri preskusu STE in so nasajene v gojišče z ustrezno gostoto, bodo ob preskušanju, tj. štiri ali pet dni po nasaditvi, dosegle več kot 80-odstotno konfluenco.

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

18. Kot topilo za raztapljanje ali suspendiranje preskusnih kemikalij se najprej izbere fiziološka raztopina. Če se preskusna kemikalija izkaže za slabo topno ali je ni mogoče vsaj pet minut enakomerno raztopiti ali suspendirati v fiziološki raztopini, se kot druga izbira za topilo uporabi 5-odstotni DMSO

▼M8

(CAS#67-68-5) v fiziološki raztopini. Za preskusne kemikalije, ki jih ni mogoče enakomerno raztopiti ali vsaj pet minut suspendirati v fiziološki raztopini ali 5-odstotnem DMSO, se kot tretja izbira za topilo uporabi mineralno olje (CAS#8042-47-5).

19. Preskusne kemikalije se enakomerno raztopijo ali suspendirajo v izbranem topilu do koncentracije 5 mas. % in nadalje razredčijo z zaporednim 10-stopenjskim redčenjem do 0,5- in 0,05-odstotne koncentracije. Vsako preskusno kemikalijo je treba preskusiti pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji. Celice, gojene na 96-jamični plošči, se za pet minut pri sobni temperaturi izpostavijo 5- ali 0,05-odstotni koncentraciji raztopine (ali suspenzije) preskusne kemikalije, in sicer se uporabi 200 µl/jamico. Preskusne kemikalije (snovi iz ene sestavine, snovi z več sestavinami ali zmesi) se štejejo za nerazredčene snovi in se razredčijo ali suspendirajo v skladu z metodo ne glede na svojo čistost.

20. Na vsaki plošči se za vsako ponovitev kot kontrola z medijem uporabi gojišče, opisano v odstavku 16. Prav tako je treba celice na vsaki plošči za vsako ponovitev izpostaviti tudi vzorcem kontrole s topilom. Topila, navedena v odstavku 18, potrjeno nimajo škodljivih učinkov na viabilnost celic SIRC.

21. Pri preskusni metodi STE je treba kot pozitivno kontrolo na vsaki plošči za vsako ponovitev uporabiti 0,01-odstotni natrijev lavril sulfat (SLS) v fiziološki raztopini. Da se izračuna viabilnost celic v pozitivni kontroli, mora vsaka plošča za vsako ponovitev vključevati tudi kontrolo s topilom v fiziološki raztopini.

22. Za določitev izravnave optične gostote je potreben slepi vzorec, ki ga je treba izvesti na jamicah, ki vsebujejo samo fosfatni pufer s soljo, ne pa tudi kalcija in magnezija (PBS-) ali celic.

23. Vsak vzorec (preskusna kemikalija pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji, kontrola z medijem, kontrola s topilom in pozitivna kontrola) je treba preskusiti v treh ponovitvah, tako da se celice za pet minut pri sobni temperaturi izpostavijo 200 µl ustrezne preskusne ali kontrolne kemikalije.

24. Primerjalne snovi so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

Meritev viabilnosti celic

25. Po izpostavitvi se celice dvakrat sperejo z 200 µl PBS in doda se 200 µl raztopine MTT (0,5 mg MTT/ml gojišča). Po dvournem reakcijskem času v inkubatorju (37 °C, 5 % CO_2) se raztopina MTT odlije, formazan MTT se 60 minut v temi pri sobni temperaturi ekstrahira z dodajanjem 200 µl 0,04 N klorovodikove kisline-izopropanola, absorbanca raztopine formazana MTT pa se izmeri pri 570 nm z uporabo čitalca plošče. Interferenca preskusnih kemikalij z analizo MTT (z barvili ali snovmi, ki neposredno zmanjšujejo MTT) se pojavi samo, če v preskusnem sistemu po spiranju po izpostavitvi ostane znatna količina preskusne kemikalije, kar velja za tridimenzionalno rekonstruirano človeško roženico ali tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, ni pa pomembno za dvodimenzionalne celične kulture, ki se uporabljajo pri preskusni metodi STE.

▼M8

Razlaga rezultatov in napovedni model

26. Vrednosti optične gostote (OD), pridobljene za vsako preskusno kemikalijo, se nato uporabijo za izračun viabilnosti celic glede na kontrolo s topilom, katere viabilnost je 100-odstotna. Relativna viabilnost celic je izražena kot delež, dobi pa se tako, da se optična gostota preskusne kemikalije deli z optično gostoto kontrole s topilom, potem ko se od obeh vrednosti odšteje optična gostota slepega vzorca.

$$viabilnost\ celic(\%) = \frac{(OD_{570}\ preskusne\ kemikalije) - (OD_{570}\ slepega\ vzorca)}{(OD_{570}\ kontrole\ s\ topilom) - (OD_{570}\ slepega\ vzorca)} \times 100$$

Podobno je kot delež izražena relativna viabilnost celic vsake kontrole s topilom, dobi pa se tako, da se optična gostota vsake kontrole s topilom deli z optično gostoto kontrole z medijem, potem ko se od obeh vrednosti odšteje optična gostota slepega vzorca.

27. Izvesti je treba tri neodvisne ponovitve, pri čemer vsaka vsebuje tri jamice s ponovljenimi vzorci (tj. n = 9). Za izračun aritmetične sredine relativne viabilnosti celic se uporabi aritmetična sredina vseh treh jamic za vsako preskusno kemikalijo in kontrolo s topilom pri vsaki neodvisni ponovitvi. Končna aritmetična sredina viabilnosti celic se izračuna iz treh neodvisnih ponovitev.

28. Mejne vrednosti viabilnosti celic za opredelitev preskusnih kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP), in preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), so navedene v nadaljevanju.

Preglednica 2

Napovedni model preskusne metode STE

Viabilnost celic		Razvrstitev po GHS ZN/ uredbi CLP	Uporaba
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	brez kategorije	snovi in zmesi, razen: (i) zelo hlapnih snovi s parnim pritiskom nad 6 kPa ([1]) in (ii) trdnih kemikalij (snovi in zmesi), ki niso površinsko aktivne snovi in zmesi, ki jih sestavljajo samo površinsko aktivne snovi
≤ 70 %	> 70 %	napoved ni mogoča	ni relevantno
≤ 70 %	≤ 70 %	kategorija 1	snovi in zmesi ([2])

([1]) Zmesi, ki vsebujejo snovi s parnim tlakom nad 6 kPa, je treba ocenjevati pazljivo, da se preprečijo morebitne prenizke razvrstitve, in jih utemeljiti za vsak primer posebej.

([2]) Na podlagi rezultatov, dobljenih v glavnem za snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja tudi omejena količina podatkov o preskušanju zmesi. Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

▼M8

Merila za sprejemljivost

29. Rezultati preskusa se štejejo za sprejemljive, če so izpolnjena vsa merila, navedena v nadaljevanju.

a) Ko se odšteje optična gostota slepega vzorca, mora biti optična gostota kontrole z medijem (izpostavljene gojišču) 0,3 ali višja.

b) Viabilnost kontrole s topilom mora biti 80-odstotna ali višja glede na kontrolo z medijem. Če se pri vsaki ponovitvi uporabi več kontrol s topilom, je več kot 80-odstotna viabilnost celic pri vsaki od teh kontrol pogoj, da se kemikalije, preskušene s temi topili, štejejo za ustrezne.

c) Viabilnost celic, dobljena s pozitivno kontrolo (0,01-odstotni SLS), mora biti znotraj dveh standardnih odklonov srednje vrednosti iz preteklih preskusov. Zgornjo in spodnjo mejo sprejemljivosti za pozitivno kontrolo je treba pogosto posodabljati, tj. vsake tri mesece ali vedno, kadar preskus izvajajo laboratoriji, ki preskuse izvajajo redko (tj. manj kot enkrat mesečno). Kadar laboratorij ne izvede zadostnega števila poskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve pozitivnih kontrol, je sprejemljivo uporabiti zgornjo in spodnjo mejo sprejemljivosti, ki ju je določil razvijalec metode, tj. med 21,1 % in 62,3 % glede na podatke laboratorija iz preteklih preskusov, medtem ko se notranja porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi.

d) Standardni odklon končne viabilnosti celic, ki izhaja iz treh neodvisnih ponovitev, mora znašati manj kot 15 % pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji preskusne kemikalije.

Če eno ali več teh meril ni izpolnjenih, je treba rezultate zavreči in izvesti nove tri neodvisne ponovitve.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

30. Navesti je treba podatke za vsako posamezno jamico (npr. vrednosti viabilnosti celic) pri vsaki ponovitvi ter skupno srednjo vrednost, standardni odklon in razvrstitev.

Poročilo o preskusu

31. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi

— Snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

— agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, LogP, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;

▼**M8**

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Pogoji in postopki preskusne metode

— Ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;

— opis uporabljene preskusne metode;

— uporabljena celična linija, njen izvor, številka pasaže in konfluenca celic, uporabljenih za preskušanje;

— podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku;

— uporabljeno število ponovitev in ponovljenih vzorcev;

— uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij (če se razlikujejo od priporočenih);

— utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo;

— trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji (če se razlikuje od priporočenega);

— opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— sklic na srednjo vrednost pozitivne kontrole iz preteklih preskusov in standardni odklon;

— dokaz usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

Rezultati

— Za vsako preskusno kemikalijo in kontrolno snov ter vsako preskušeno koncentracijo je treba v preglednici navesti posamezne vrednosti optične gostote na jamico s ponovljenimi vzorci, aritmetično sredino vrednosti optične gostote za vsako neodvisno ponovitev, delež viabilnosti celic za vsako neodvisno ponovitev ter končno aritmetično sredino deleža viabilnosti celic in standardnega odklona v treh ponovitvah;

— rezultate za kontrolo z medijem, kontrolo s topilom in pozitivno kontrolo, ki dokazujejo ustrezna merila za sprejemljivost študije;

— opis drugih opaženih učinkov;

— splošno izpeljano razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

▼**M8**

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott, L., *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.

(3) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

(4) Takahashi, Y., *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760–770.

(5) Sakaguchi, H., *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796–809.

(6) Kojima, H., *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, str. 1855–1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Na voljo na: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.

(9) Saito, K., *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson, T. J., Chrai, S. S., in Robinson, J. R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci. 1648–1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (št. 48. (2)), Bruselj, Belgija.

(12) Gautheron, P., *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 263). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼M8

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (13).

Primerjalna snov: snov, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir; (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušanega razreda; (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti; (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu želenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za ‚popravljive učinke na oči' in kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP.

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Kontrola z medijem: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo $\geq$ 10 mas. % in $<$ 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

▼M8

OD: optična gostota.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (10).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (13).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (10).

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za ‚nepopravljive učinke na oči' in kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z medijem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (13).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez katerega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Površinsko aktivna snov: kemikalija, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M8

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

Kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP: glej ‚Huda poškodba oči‘.

Kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP: glej ‚Draženje oči‘.

Brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP: kemikalije, ki niso razvrščene v kategorijo 1 ali 2 po GHS ZN/uredbi CLP (ali kategorijo 2A ali 2B po GHS ZN).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼M8

B.69 **PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU (RhCE), ZA OPREDELITEV KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 492 (2017). *Huda poškodba oči* pomeni povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]). Prav tako v skladu z GHS ZN in uredbo CLP *draženje oči* pomeni povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Preskusne kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči, se razvrstijo v kategorijo 1 po GHS ZN in uredbi CLP, tiste, ki povzročajo draženje oči, pa v kategorijo 2 po GHS ZN in uredbi CLP. Preskusne kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, so opredeljene kot kemikalije, ki ne izpolnjujejo meril za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN in uredbi CLP, kar pomeni, da se nanje sklicuje kot na kemikalije brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP.

2. Huda poškodba oči/draženje oči se je običajno ocenjevala z uporabo laboratorijskih živali (TM B.5 (2)). Izbiro najustreznejše preskusne metode in uporabo te preskusne metode je treba obravnavati v okviru smernice OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi s hudimi poškodbami oči in draženjem oči (39).

3. Ta preskusna metoda opisuje postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Pri njej se uporablja rekonstruiran epitelij, podoben človeškemu roženičnemu (RhCE), ki ima zelo podobne histološke, morfološke, biokemijske in fiziološke značilnosti kot epitelij človeške roženice. Da bi se obravnavala končna točka hude poškodbe oči/draženje oči z vidika zdravja ljudi, so bile validirane, obravnavane kot znanstveno veljavne in sprejete še štiri druge preskusne metode *in vitro*, in sicer preskusne metode B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) in B.68 (6).

4. V to preskusno metodo sta vključena dva validirana, na trgu dostopna modela rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu. Validacijske študije za oceno draženja oči/hudih poškodb oči so bile izvedene (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) z uporabo preskusov EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) in SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Pri vsakem od teh preskusov se kot preskusni sistem uporabijo na trgu dostopne konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, v nadaljevanju pa sta navedena kot validirani referenčni metodi – VRM 1 oziroma VRM2. Na podlagi teh

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M8

validacijskih študij in njunega neodvisnega medsebojnega strokovnega pregleda (9) (12) je bilo ugotovljeno, da se lahko s preskusoma EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT pravilno opredelijo kemikalije (tako snovi kot zmesi), ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN, preskusa pa sta bila v ta namen priporočena kot znanstveno veljavna (13).

5. Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče v celoti nadomestiti z eno samo preskusno metodo *in vitro* (2) (14), da bi se predvidel celoten razpon odzivov na hude poškodbe oči/ draženje oči za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko v celoti nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjskih) strategij preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor/od zgoraj navzdol (15). Pristop od spodaj navzgor (15) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti, pristop od zgoraj navzdol (15) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo kemikalija povzročila hudo poškodbo oči. Preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT se priporočata za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (brez kategorije) brez nadaljnjega preskušanja, v okviru strategije preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor/od zgoraj navzdol, ki ga Scott *et al.* na primer priporočajo kot prvi korak pri pristopu od spodaj navzgor ali enega od zadnjih korakov pri pristopu od zgoraj navzdol (15). Vendar preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT nista namenjena razlikovanju med kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP (huda poškodba oči) in kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP (draženje oči). To razlikovanje bo treba obravnavati z drugo stopnjo preskusne strategije (15). Preskusna kemikalija, za katero se s preskusom EpiOcular™ EIT ali SkinEthic™ HCE EIT ugotovi, da jo je treba razvrstiti glede na draženje oči/hude poškodbe oči, torej zahteva dodatno preskušanje (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se sprejme dokončen sklep (brez kategorije, kategorija 1 ali kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP), na primer z uporabo preskusne metode B.47, B.48, B.61 ali B.68.

6. V tej preskusni metodi je opisan postopek za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da v konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, povzroči citotoksičnost, kot je izmerjena z analizo MTT (16) (glej odstavek 21). Viabilnost tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, po izpostavitvi preskusni kemikaliji se določi glede na tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo (delež viabilnosti), nato pa se uporabi za napoved potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči.

7. Na voljo so standardi izvajanja (17), da se olajša validacija novih ali prilagojenih *in vitro*preskusov na podlagi rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, ki so podobni preskusoma EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT, v skladu z načeli iz Smernice OECD 34 (18), in omogoči pravočasna sprememba Smernice OECD za preskušanje 492 za njuno vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov v skladu s sporazumom OECD bo zagotovljeno le za preskuse, validirane v skladu s standardi izvajanja, če je te preskuse pregledala OECD in jih vključila v ustrezno smernico za preskušanje.

OPREDELITVE POJMOV

8. Opredelitve so navedene v Dodatku 1.

▼M8

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

9. Ta preskusna metoda temelji na tridimenzionalnih konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (RhCE), ki so dostopne na trgu in se proizvajajo bodisi iz primarnih keratinocitov človeške pokožnice (tj. EpiOcular™ OCL-200) bodisi iz nesmrtnih človeških epitelnih celic roženice (tj. SkinEthic™ HCE/S). Konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, EpiOcular™ OCL-200 in SkinEthic™ HCE/S sta podobni tridimenzionalni strukturi roženičnega epitelija *in vivo* in se proizvajata iz celic preiskovane vrste (19) (20). Poleg tega se s preskusoma neposredno meri citotoksičnost, ki je posledica prehajanja kemikalije skozi roženico ter nastanka poškodb celic in tkiva; od citotoksičnega odziva je nato odvisen splošni rezultat hude poškodbe oči/draženja oči *in vivo*. Poškodbe celic lahko nastanejo zaradi različnih načinov delovanja (glej odstavek 20), vendar ima citotoksičnost pomembno, če ne glavno mehanistično vlogo pri določanju skupnega odziva na kemikalijo s hudo poškodbo oči/draženjem oči, ki se *in vivo* kaže predvsem z motnjavo roženice, vnetjem šarenice, rdečino veznice in/ali hemozo veznice, ne glede na fizikalno-kemijske procese, ki povzročajo poškodbo tkiva.

10. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preskušen širok nabor kemikalij, ki zajemajo najrazličnejše kemijske vrste, kemijske razrede, molekulske mase, LogP, kemijske strukture itd. Validacijska zbirka podatkov o preskusu EpiOcular™ EIT je vsebovala skupaj 113 kemikalij, ki zajemajo 95 različnih organskih funkcionalnih skupin glede na analizo z orodjem OECD QSAR (8). Večino teh kemikalij so predstavljale snovi iz ene sestavine, vendar je bilo v študijo vključenih tudi več snovi z več sestavinami (vključno s tremi homopolimeri, petimi kopolimeri in desetimi kvazipolimeri). Glede na agregatno stanje in kategorije po GHS ZN/uredbi CLP je bilo 113 preskušenih kemikalij razvrščenih tako: 13 tekočih snovi kategorije 1, 15 trdnih snovi kategorije 1, 6 tekočih snovi kategorije 2A, 10 trdnih snovi kategorije 2A, 7 tekočih snovi kategorije 2B, 7 trdnih snovi kategorije 2B, 27 tekočih snovi brez kategorije in 28 trdnih snovi brez kategorije (8). Validacijska zbirka podatkov o preskusu SkinEthic™ HCE EIT je vsebovala skupaj 200 kemikalij, ki zajemajo 165 različnih organskih funkcionalnih skupin (8) (10) (11). Večino teh kemikalij so predstavljale snovi iz ene sestavine, vendar je bilo v študijo vključenih tudi več snovi z več sestavinami (vključno z 10 polimeri). Glede na agregatno stanje in kategorije po GHS ZN/uredbi CLP je bilo 200 preskušenih kemikalij razvrščenih tako: 27 tekočih snovi kategorije 1, 24 trdnih snovi kategorije 1, 19 tekočih snovi kategorije 2A, 10 trdnih snovi kategorije 2A, 9 tekočih snovi kategorije 2B, 8 trdnih snovi kategorije 2B, 50 tekočih snovi brez kategorije in 53 trdnih snovi brez kategorije (10) (11).

11. Ta preskusna metoda se uporablja za snovi in zmesi ter trdne snovi, tekoče snovi, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli v validacijski študiji niso bili ocenjeni. Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškem roženičnemu, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

12. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v enakem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju), in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (v formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti tkiva, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole. Vrsta prilagojenih kontrol, ki so lahko potrebne, je odvisna od vrste interference, ki jo povzroča preskusna kemikalija, in postopka za kvantifikacijo formazana MTT (glej odstavke 36–42).

▼**M8**

13. Rezultati, dobljeni s predvalidacijsko (21) (22) in popolno validacijsko (8) (10) (11) študijo, dokazujejo, da se lahko preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT preneseta v laboratorije, za katere se šteje, da nimajo izkušenj z izvajanjem preskusov, ter da ju je mogoče obnoviti znotraj laboratorija in med laboratoriji. Na podlagi teh študij je stopnja obnovljivosti v smislu ujemanja napovedi, ki ga je mogoče pričakovati pri preskusu EpiOcular™ EIT glede na podatke o 113 kemikalijah, v enem laboratoriju 95-odstotna, v več laboratorijih pa 93-odstotna. Stopnja obnovljivosti v smislu ujemanja napovedi, ki ga je mogoče pričakovati pri preskusu SkinEthic™ HCE EIT glede na podatke o 120 kemikalijah, je v enem laboratoriju 92-odstotna, v več laboratorijih pa 95-odstotna.

14. Preskus EpiOcular™ EIT se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Glede na podatke, pridobljene v validacijski študiji (8), ima preskus EpiOcular™ EIT 80-odstotno splošno točnost (na podlagi 112 kemikalij), 96-odstotno občutljivost (na podlagi 57 kemikalij), 4-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 57 kemikalij), 63-odstotno specifičnost (na podlagi 55 kemikalij) in 37-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 55 kemikalij) v primerjavi s podatki *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), razvrščenimi v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Študija, v kateri je bilo s preskusom EpiOcular™ EIT preskušenih 97 tekočih agrokemijskih pripravkov, je dokazala podobno učinkovitost preskusne metode za to vrsto zmesi, kot je bila dobljena v validacijski študiji (23). 97 pripravkov je bilo razvrščenih tako: 21 kategorije 1, 19 kategorije 2A, 14 kategorije 2B in 43 brez kategorije, razvrščenih v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN na podlagi podatkov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14). Dobljeni so bili 82-odstotna splošna točnost (na podlagi 97 pripravkov), 91-odstotna občutljivost (na podlagi 54 pripravkov), 9-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 54 pripravkov), 72-odstotna specifičnost (na podlagi 43 pripravkov) in 28-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 43 pripravkov) (23).

15. Preskus SkinEthic™ HCE EIT se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Glede na podatke, pridobljene v validacijski študiji (10) (11), ima preskus SkinEthic™ HCE EIT 84-odstotno splošno točnost (na podlagi 200 kemikalij), 95-odstotno občutljivost (na podlagi 97 kemikalij), 5-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 97 kemikalij), 72-odstotno specifičnost (na podlagi 103 kemikalij) in 28-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 103 kemikalij) v primerjavi s podatki *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), razvrščenimi v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP.

16. Deleža lažno negativnih rezultatov, dobljena z obema preskusoma rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za snovi ali zmesi spadata v okvir 12-odstotne splošne verjetnosti, da bodo kemikalije z Draizovim preskusom draženja oči *in vivo* pri ponovljenih preskusih opredeljene kot kategorija 2 po GHS ZN in uredbi CLP ali brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP; razlog za to je variabilnost znotraj preskusa, ki je neločljivo povezana z metodo (24). Deleža lažno pozitivnih rezultatov, dobljena z obema preskusnima metodama rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za snovi ali zmesi, nista ključna v okviru te preskusne metode, saj je za vse preskusne kemikalije, ki povzročajo viabilnost tkiva, največ enako določenim mejnim vrednostim (glej odstavek 44), potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami *in vitro* ali – kot zadnja možnost pri kuncih –, odvisno od regulativnih zahtev, uporaba strategije zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na

▼M8

zanesljivosti dokazov. Ti preskusni metodi se lahko uporabita za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba negativni rezultat sprejeti, kot da ne razvršča kemikalije glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP). Pred uporabo preskusov EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso sistemi po GHS ZN/uredbi CLP, se je treba posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi.

17. Omejitev te preskusne metode je, da ne omogoča razlikovanja med draženjem oči/popravljivimi učinki na oči (kategorija 2) in hudo poškodbo oči/nepopravljivimi učinki na oči (kategorija 1), kot so opredeljeni z GHS ZN in uredbo CLP, niti med dražilnimi snovmi za oči (neobvezna kategorija 2A) in blagimi dražilnimi snovmi za oči (neobvezna kategorija 2B), kot so opredeljene z GHS ZN (1). Za te namene je potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami *in vitro*.

18. Pojem, preskusna kemikalija' se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša ([1]), in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za preskušanje snovi in/ali zmesi.

NAČELO PRESKUSA

19. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na vsaj dve tridimenzionalni konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, nato pa se po izpostavljenosti in inkubacijski dobi po tretiranju izmeri viabilnost tkiv. Tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, se rekonstruirajo iz primarnih keratinocitov človeške pokožnice ali nesmrtnih človeških epitelnih celic roženice, ki so se gojile več dni, tako da tvorijo razslojen, zelo diferenciran skvamozni epitelij, ki je morfološko podoben tistemu v človeški roženici. Konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, pri preskusu EpiOcular™ sestavljajo vsaj tri vidne plasti celic in neporoženela površina, katere struktura je podobna roženici *in vivo*. Konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, pri preskusu SkinEthic™ HCE sestavljajo vsaj štiri vidne plasti celic, ki vključujejo stebričaste bazalne celice, prehodne krilaste celice in površinske skvamozne celice, podobne celicam normalnega človeškega roženičnega epitelija (20) (26).

20. S kemikalijo izzvane hude poškodbe oči/draženje oči, ki se *in vivo* kažejo predvsem z motnjavo roženice, vnetjem šarenice, rdečino veznice in/ali hemozo veznice, so rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem kemikalije skozi roženico in/ali veznico in nastankom poškodb celic. Poškodbe celic lahko nastanejo z različnimi načini delovanja, vključno z: lizo celične membrane (npr. s površinsko aktivnimi snovmi, organskimi topili); koagulacijo makromolekul (zlasti proteinov) (npr. s površinsko aktivnimi snovmi, organskimi topili, bazami in kislinami); umiljenjem lipidov (npr. z bazami) in alkilacijo ali drugimi kovalentnimi interakcijami z makromolekulami (npr. z belili, peroksidi in alkilatorji) (15) (27) (28). Vendar je bilo dokazano, da ima citotoksičnost pomembno, če ne glavno mehanistično vlogo pri določanju skupnega odziva na kemikalijo s hudo poškodbo oči/draženjem oči, ne glede na fizikalno-kemijske procese, ki povzročijo poškodbo tkiva (29) (30). Poleg tega je potencial kemikalije, da povzroči hude poškodbe oči/draženje oči, odvisen predvsem od obsega začetne poškodbe (31), ki je v korelaciji z obsegom celične smrti (29) ter obsegom poznejših odzivov in morebitnih rezultatov (32). Tako rahlo dražilne snovi

([1]) Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju OECD sprejet dogovor, da bi bilo treba v novih in posodobljenih smernicah OECD za preskušanje pojem,preskusna kemikalija', ki opisuje, kaj se preskuša, zdaj dosledneje uporabljati, kjer je to mogoče.

▼M8

običajno prizadenejo samo površinski epitelij roženice, blago in zmerno dražilne snovi poškodujejo predvsem epitelij in površinsko stromo, zelo dražilne snovi pa poškodujejo epitelij, globoko stromo in včasih roženični endotelij (30) (33). Merjenje viabilnosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, po lokalni izpostavitvi preskusni kemikaliji, da bi se opredelile kemikalije, ki jih ni treba razvrstiti glede na hude poškodbe oči/draženje oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP), temelji na domnevi, da vse kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči ali draženje oči, povzročajo citotoksičnost v roženičnem epiteliju in/ali veznici.

21. Viabilnost tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, se običajno meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid; številka CAS 298–93-1), ki jo povzročijo viabilne celice tkiva, v sol modrega formazana, količina katere se kvantitativno izmeri po ekstrakciji iz tkiv (16). Kemikalije, ki jih ni treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (brez kategorije), so opredeljene kot kemikalije, ki ne zmanjšujejo viabilnosti tkiva pod določen prag (tj. viabilnost tkiva > 60 % pri preskusih EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EITL ([1]) ali > 50 % pri preskusu SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (glej odstavek 44).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

22. Pred redno uporabo preskusov rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za regulativne namene morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno napovejo 15 kemikalij za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane med kemikalijami, uporabljenimi v validacijskih študijah VRM (8) (10) (11). Kolikor je mogoče, so bile v izbor vključene kemikalije, ki: (i) zajemajo različna agregatna stanja; (ii) zajemajo celoten razpon odzivov *in vivo* s hudimi poškodbami oči/draženjem oči na podlagi visokokakovostnih rezultatov, dobljenih v referenčnem *in vivo* preskusu draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), ter sistema za razvrščanje po GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (1) in sistema za razvrščanje po uredbi CLP (tj. kategoriji 1 in 2 ali brez kategorije); (iii) zajemajo različne dejavnike razvrščanja *in vivo* (24) (25); (iv) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijski študiji (8) (10) (11); (v) dobro in široko predstavljajo organske funkcionalne skupine (8) (10) (11); (vi) imajo dobro opredeljene kemijske strukture (8) (10) (11); (vii) so obarvane in/ali neposredno zmanjšujejo MTT; (viii) so povzročile obnovljive rezultate pri preskusnih metodah rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, med njihovo validacijo; (ix) so bile pravilno napovedane s preskusnimi metodami rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, med njihovimi validacijskimi študijami; (x) zajemajo celoten razpon odzivov *in vitro* na podlagi visokokakovostnih podatkov o preskusnih metodah rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (od 0- do 100-odstotna viabilnost); (xi) so na voljo na trgu in (xii) se ne povezujejo s previsokimi stroški pridobivanja in/ali odstranjevanja. V primerih, ko kemikalija s seznama ni na voljo ali je ni mogoče uporabiti iz drugih utemeljenih razlogov, se lahko uporabi druga kemikalija, ki izpolnjuje zgoraj opisana merila, npr. spada med kemikalije, ki so bile uporabljene pri validaciji VRM. Taka odstopanja je treba sicer utemeljiti.

([1]) EITL: EIT za tekočine v primeru preskusa SkinEthic™ HCE.
([2]) EITS: EIT za trdne snovi v primeru preskusa SkinEthic™ HCE.

▼M8

Preglednica 1

Seznam kemikalij za preverjanje usposobljenosti

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina ([1])	Agregatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) ([2])	Viabilnost VRM2 (%) ([3])	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
Kategorija 1 *in vivo* ([4])								
Metil tioglikolat	2365-48-2	karboksilna kislina, ester; tioalkohol	tekoče	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	napoved ni mogoča	da (močen)	ne
Hidroksietil akrilat	818-61-1	akrilat; alkohol	tekoče	7,5 ± 4,7 ([5])	1,6 ± 1,0	napoved ni mogoča	ne	ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	alkohol	trdno	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	napoved ni mogoča	ne	ne
Natrijev oksalat	62-76-0	oksokarboksilna kislina	trdno	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	napoved ni mogoča	ne	ne
***Kategorija 2A* in vivo** ([4])								
2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamid, N,N'-bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodni) ([6])	18472-51-0	aromatski heterociklični halid; aril halid; dihidroksilna skupina; gvanidin	tekoče	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	napoved ni mogoča	ne	da (šibek)
Natrijev benzoat	532-32-1	aril; karboksilna kislina	trdno	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	napoved ni mogoča	ne	ne
***Kategorija 2B* in vivo** ([4])								
Dietil toluamid	134-62-3	benzamid	tekoče	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	napoved ni mogoča	ne	ne
2,2-dimetil-3-metilenbiciklo [2.2.1] heptan	79-92-5	alkan, razvejan s terciarnim ogljikom; alken; bicikloheptan; premoščene karbociklične spojine; cikloalkan	trdno	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	napoved ni mogoča	ne	ne
***Brez kategorije* in vivo** ([4])								
1-etil-3-metilimidazolijev etilsulfat	342573-75-5	alkoksi; amonijeva sol; aril; imidazol; sulfat	tekoče	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	brez kat.	ne	ne

▼M8

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina ([1])	Agregatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) ([2])	Viabilnost VRM2 (%) ([3])	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
Dikaprilil eter	629-82-3	alkoksi; eter	tekoče	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	brez kat.	ne	ne
Piperonil butoksid	51-03-6	alkoksi; benzodioksol; benzil; eter	tekoče	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	brez kat.	ne	ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidrogenirano ricinusovo olje	61788-85-0	acilal; alkohol; alil; eter	viskozno	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	brez kat.	ne	ne
1-(4-klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil) ureja	101-20-2	aromatski heterociklični halid; aril halid; derivati ureje	trdno	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	brez kat.	ne	ne
2,2′-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol)	103597-45-1	alkan, razvejan s kvarternim ogljikom; združena aromatska karbociklična spojina; združeni nasičeni heterocikli; prekurzorske kvinoidne spojine; terc-butil	trdno	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	brez kat.	ne	ne
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	anorganska sol	trdno	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Brez kat.	ne	ne

Kratice:

št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); GHS ZN = globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (1); VRM1 = validirana referenčna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referenčna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; barvna interf. = barvna interferenca pri meritvi standardne absorbance (optična gostota (OD)) formazana MTT.

([1]) Organska funkcionalna skupina, dodeljena glede na ugnezdeno analizo z orodjem OECD Toolbox 3.1 (8).

([2]) Na podlagi rezultatov, dobljenih s preskusom EpiOcular™ EIT , v validacijski študiji EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

([3]) Na podlagi rezultatov, dobljenih s preskusom SkinEthic™ HCE EIT, v validacijski študiji (10) (11).

([4]) Na podlagi rezultatov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5/OECD TG 405) (2) (14) in z uporabo GHS ZN.

([5]) Na podlagi rezultatov, dobljenih v CEFIC CONsortium, za študijo strategije preskušanja draženja oči *in vitro* (CON4EI).

([6]) Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deveti dan.

23. Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deveti dan. V okviru preskušanja usposobljenosti se priporoča, naj uporabniki po prejetju preverijo značilnosti pregrade tkiv, kakor to določa proizvajalec konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (glej odstavke 25, 27 in 30). To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskus uspešno vzpostavljen ter je pridobljena in dokazana usposobljenost za njegovo uporabo, tako redno preverjanje ni več potrebno. Vendar se priporoča, da se ob redni uporabi preskusa v rednih časovnih razmikih še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade.

▼M8

POSTOPEK

24. Preskusa, ki sta zdaj zajeta s to preskusno metodo, sta znanstveno veljavna EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), imenovana validirana referenčna metoda (VRM1 oziroma VRM2). Na voljo so standardni delovni postopki za preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, ki jih je treba uporabljati pri izvajanju in uporabi preskusnih metod v laboratoriju (34) (35). V naslednjih odstavkih in Dodatku 2 so opisani glavni elementi in postopki preskusov rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu.

ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU

Splošni pogoji

25. Za rekonstrukcijo tridimenzionalnega tkiva epitelija, podobnega roženičnemu, ki mora biti sestavljen iz postopno razslojenih, vendar ne poroženelih celic, je treba uporabiti ustrezne človeške celice. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, se pripravi v vstavkih s porozno sintetično membrano, skozi katero lahko hranila prehajajo do celic. V rekonstruiranem epiteliju, podobnem roženičnemu, mora biti več slojev živih, neporoženelih epitelijskih celic. Epitelna površina konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora biti v neposrednem stiku z zrakom, da se omogoči neposredna lokalna izpostavljenost preskusnim kemikalijam, podobno kot bi bil roženični epitelij izpostavljen *in vivo*. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora tvoriti dovolj močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih snovi, npr. Tritona X-100 ali natrijevega dodecil sulfata (SDS). Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti tkiva za 50 % (ET_{50}) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne snovi (npr. 100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. %), ali koncentracije, pri kateri se zaradi primerjalne snovi po določenem času izpostavljenosti viabilnost tkiv zmanjša za 50 % (IC_{50}) (npr. 30-minutno tretiranje s 50 µl SDS) (glej odstavek 30). Zadrževalne značilnosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, morajo preprečevati prehod preskusne kemikalije okoli robu viabilnega tkiva, kar bi lahko preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo roženice. Človeške celice, uporabljene za pripravo konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, ne smejo biti okužene z bakterijami, virusi, mikoplazmo ali glivami. Sterilnost konstrukcije tkiva mora preveriti dobavitelj, da izključi okužbo z glivami ali bakterijami.

Pogoji za funkcionalnost

Viabilnost

26. Preskus, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti tkiva, je analiza MTT (16). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantificira bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (optična gostota (OD)) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (36). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. OD < 0,1. Uporabniki konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, morajo zagotoviti, da vsaka serija konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za validirani preskusni metodi so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. V poročilu o preskusu je treba evidentirati, da so tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo, obstojna v kulturi (zagotoviti je treba podobne meritve viabilnosti tkiva) med celotnim trajanjem preskusnega obdobja izpostavljenosti. Podoben postopek mora proizvajalec tkiva uporabiti v okviru kontrole

▼M8

kakovosti ob sprostitvi serij tkiv, vendar se lahko v tem primeru uporabijo drugačna merila za sprejemljivost, kot so navedena v preglednici 2. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (v pogojih kontrole kakovosti preskusne metode) mora določiti razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu.

Preglednica 2

Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (za uporabnike preskusa)

Preskus	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (za protokol za tekoče snovi in protokol za trdne snovi)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (za protokol za tekoče snovi in protokol za trdne snovi)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Pri tej meji sprejemljivosti se upošteva možnost podaljšanega časa dobave/hrambe (npr. > 4 dni), ki dokazano ne vpliva na učinkovitost preskusne metode (37).

Pregradna funkcija

27. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora biti dovolj debela in trdna, da zaustavi hitro penetracijo citotoksičnih primerjalnih snovi, ocenjenih npr. z ET_{50} (Triton X-100) ali IC_{50} (SDS) (preglednica 3). Pregradno funkcijo vsake serije uporabljene konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora dokazati njen razvijalec/prodajalec ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 30).

Morfologija

28. Histološki pregled konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora dokazati strukturo epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (vključno z vsaj tremi plastmi živih epitelijskih celic in neporoženelo površino). Za VRM je ustrezno morfologijo določil razvijalec/dobavitelj, zato je uporabniku preskusne metode ni treba znova dokazovati za vsako uporabljeno serijo tkiv.

Obnovljivost

29. Rezultati pozitivnih in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazovati obnovljivost v daljšem časovnem obdobju.

Kontrola kakovosti

30. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi sta najpomembnejši merili za viabilnost (odstavek 26) in pregradno funkcijo (glej odstavek 27). Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za pregradne funkcije, izmerjene z ET_{50} ali IC_{50} (glej odstavka 25 in 26), mora določiti razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu. Razpon sprejemljivosti ET_{50} in IC_{50}, ki ga kot merilo za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij uporabi razvijalec/dobavitelj konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (uporabljenih v VRM), je naveden v preglednici 3. Podatke, ki dokazujejo skladnost z vsemi merili za sprostitev proizvodnje, mora razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, zagotoviti uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Za zanesljivo napoved kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN in uredbo CLP, se lahko sprejmejo samo rezultati, dobljeni s tkivi, ki izpolnjujejo vsa ta merila za sprostitev proizvodnje.

▼M8

Preglednica 3

Merilo za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij

Preskus	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. %)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30-minutno tretiranje s 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

31. Za vsako preskusno kemikalijo in vsako kontrolno snov je treba pri vsaki ponovitvi uporabiti vsaj dva ponovljena vzorca tkiva. Uporabljata se dva različna protokola tretiranja, in sicer eden za tekoče preskusne kemikalije in eden za trdne preskusne kemikalije (34) (35). Za obe metodi in protokola je treba površino konstrukcije tkiva pred nanosom preskusnih kemikalij navlažiti z Dulbeccovim fosfatnim pufrom s soljo (PBS) brez kalcija in magnezija (DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}), da se posnema vlažnost v človeškem očesu. Tretiranje tkiv se začne z izpostavitvijo preskusnim kemikalijam in kontrolnim snovem. Pri obeh protokolih tretiranja pri obeh VRM je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije ali kontrolne snovi, da se enakomerno prekrije površina epitelija, pri čemer mora biti odmerek natančno določen (glej odstavka 32 in 33) (Dodatek 2).

32. Pri VRM se kot tekoče snovi obravnavajo preskusne kemikalije, ki jih je mogoče odmeriti s pipeto pri 37 °C ali nižjih temperaturah (po potrebi z uporabo pipete za neposredno izpodrivanje tlaka), sicer jih je treba obravnavati kot trdne snovi (glej odstavek 33). Pri VRM se tekoča preskusna kemikalija enakomerno porazdeli po površini tkiva (tj. vsaj 60 µl/cm^2 nanosa) (glej odstavek 2 (33) (34)). Kolikor je mogoče, je treba preprečiti kapilarne učinke (učinki površinske napetosti), ki se lahko pojavijo zaradi nanosa majhnih količin v vstavek (na površini tkiva), da se zagotovi pravilno odmerjanje tkiva. Tkiva, tretirana s tekočimi preskusnimi kemikalijami, se 30 minut inkubirajo pri standardnih pogojih gojenja (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost). Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba tekočo preskusno kemikalijo in kontrolne snovi pazljivo odstraniti s površine tkiva, in sicer z izdatnim spiranjem z DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+} pri sobni temperaturi. Tej fazi spiranja sledi potopitev v sveže gojišče po izpostavljenosti pri sobni temperaturi (da se odstrani preskusna kemikalija, ki se je morda absorbirala v tkivo) za predhodno določen čas, ki je odvisen od uporabljene VRM. Samo pri VMR1 se inkubacija po izpostavljenosti v svežem gojišču pri standardnih pogojih gojenja uporabi pred izvedbo analize MTT (glej Dodatek 2 (34) (35)).

33. Preskusne kemikalije, ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto pri temperaturi do 37 °C, se pri VRM obravnavajo kot trdne snovi. Nanesti je treba zadostno količino preskusne kemikalije, da prekrije celotno površino tkiva, tj. nanesti je treba vsaj 60 mg/cm^2 (Dodatek 2). Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. Tkiva, tretirana s trdnimi preskusnimi kemikalijami, se za predhodno določen čas (odvisno od uporabljene VRM) inkubirajo pri standardnih pogojih gojenja (glej Dodatek 2 (34) (35)). Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba trdno preskusno kemikalijo in kontrolne

▼M8

snovi pazljivo odstraniti s površine tkiva, in sicer z izdatnim spiranjem z DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+} pri sobni temperaturi. Tej fazi spiranja pred izvedbo analize MTT sledita potopitev v sveže gojišče po izpostavljenosti pri sobni temperaturi (da se odstrani preskusna kemikalija, ki se je morda absorbirala v tkivo) za predhodno določeno obdobje, ki je odvisno od uporabljene VRM, in inkubacija po izpostavljenosti v svežem gojišču pri standardnih pogojih gojenja (glej Dodatek 2 (34) (35)).

34. Pri vsaki ponovitvi je treba vključiti sočasno negativno in pozitivno kontrolo, da se dokaže, da sta viabilnost (določena pri negativni kontroli) in občutljivost (določena pri pozitivni kontroli) tkiv znotraj območij sprejemljivosti, opredeljenih na podlagi podatkov iz preteklih preskusov. Sočasna negativna kontrola je tudi izhodišče (100-odstotna viabilnost tkiva) za izračun relativnega deleža viabilnosti tkiv, tretiranih s preskusno kemikalijo (%$Viabilnost_{preskus}$). Priporočena snov za pozitivno kontrolo, ki se uporabi pri VRM, je čisti metilacetat (št. CAS 79-20-9, na trgu na voljo npr. pri podjetju Sigma-Aldrich, kat. št. 45997; tekočina). Priporočeni snovi za negativno kontrolo, ki se uporabita pri VRM1 in VRM2, sta ultra čista H_2O oziroma DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}. To so kontrolne snovi, ki so bile uporabljene v validacijskih študijah VRM in za katere obstaja največ podatkov iz preteklih preskusov. Uporaba ustreznih alternativnih snovi za pozitivno ali negativno kontrolo mora biti znanstveno in ustrezno utemeljena. Negativne in pozitivne kontrole je treba preskusiti z enakimi protokoli, kot so bili uporabljeni za preskusne kemikalije, vključene v ponovitev (tj. za tekoče in/ali trdne snovi). Temu nanosu morajo slediti izpostavljenost tretiranju, spiranje, potopitev po izpostavitvi in inkubacija po izpostavitvi, če je ustrezno, kot je opisano za kontrole, izvedene sočasno s tekočimi preskusnimi kemikalijami (glej odstavek 32), ali za kontrole, izvedene sočasno s trdnimi preskusnimi kemikalijami (glej odstavek 33), pred izvedbo analize MTT (glej odstavek 35) (34) (35). En sam niz negativne in pozitivne kontrole zadostuje za vse preskusne kemikalije v istem agregatnem stanju (tekoče ali trdne snovi), vključene v isto ponovitev.

Meritve viabilnosti tkiv

35. Analiza MTT je standardizirana kvantitativna metoda (16), ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti tkiv. Ustreza uporabi tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Analiza MTT se izvede takoj po obdobju inkubacije, ki sledi izpostavitvi. Pri VRM se vzorec konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za 180 ± 15 minut potopi v 0,3 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml pri standardnih pogojih gojenja. Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT. Oborina modrega formazana MTT se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo ustrezne količine izopropanola (ali podobnega topila) (34) (35). Tkiva, preskušena s tekočimi preskusnimi kemikalijami, je treba ekstrahirati iz zgornjega in spodnjega dela tkiv, tkiva, preskušena s trdnimi preskusnimi kemikalijami in obarvanimi tekočinami, pa je treba ekstrahirati samo iz spodnjega dela tkiva (da se zmanjša potencialna kontaminacija ekstrakcijske raztopine izopropanola s preskusno kemikalijo, ki je morda ostala na tkivu). Tkiva, preskušena s tekočimi preskusnimi kemikalijami, ki se težko sperejo, se prav tako lahko ekstrahirajo samo iz spodnjega dela. Sočasno preskušane snovi za negativno in pozitivno kontrolo je treba tretirati podobno kot preskusno kemikalijo. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi z meritvijo standardne absorbance (OD) pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ ± 30 nm ali s postopkom spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavek 42) (11) (36).

▼**M8**

36. Optične lastnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko ovirajo meritev formazana MTT, kar lahko povzroči lažno oceno viabilnosti tkiv. Preskusne kemikalije lahko vplivajo na meritev formazana MTT z neposredno redukcijo MTT v modri formazan MTT in/ali z barvno interferenco, če preskusna kemikalija naravno ali zaradi postopkov tretiranja absorbira v istem razponu optične gostote kot formazan MTT (tj. približno 570 nm). Pred preskušanjem je treba izvesti predhodna preverjanja, da se opredelijo morebitne snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali kemikalije, ki povzročajo barvno interferenco, poleg tega je treba uporabiti dodatne kontrole, da se zazna in popravi morebitna interferenca zaradi takih preskusnih kemikalij (glej odstavke 37–41). To je še zlasti pomembno, če se določena preskusna kemikalija iz konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, s spiranjem ne odstrani v celoti ali če prodre v roženični epitelij, tako da je med analizo MTT prisotna v konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu. Za preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju) in zaradi premočne interference niso združljive z meritvijo standardne absorbance (OD) formazana MTT, tj. močna absorpcija pri 570 ± 30 nm, se lahko za merjenje formazana MTT uporabi postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavka 41 in 42) (11) (36). Za podrobnejši opis načina zaznave in popravka neposredne redukcije MTT in vpliva barvil glej standardne delovne postopke za VRM (34) (35). V dodatkih III oziroma IV so na voljo tudi ponazoritveni shematski prikazi z navodili o tem, kako pri VRM1 in VRM2 opredeliti in obravnavati snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali kemikalije, ki povzročajo barvno interferenco.

37. Za opredelitev morebitne interference zaradi preskusnih kemikalij, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju), in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, se preskusna kemikalija doda v vodo in/ali izopropanol ter ustrezno dolgo inkubira pri sobni temperaturi (glej Dodatek 2, (34) (35)). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira dovolj svetlobe v razponu 570 ± 20 nm pri VRM1 (glej Dodatek 3) ali če pri mešanju preskusne kemikalije z vodo nastane obarvana raztopina pri VRM2 (glej Dodatek 4), se domneva, da preskusna kemikalija vpliva na meritev standardne absorbance (OD) formazana MTT, zato je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 41 in 42 ter dodatka III in IV) (34) (35). Pri meritvi standardne absorbance (OD) je treba vsako motečo preskusno kemikalijo nanesti na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva, na katerih se izvede celotni postopek preskušanja, vendar se inkubirajo z gojiščem namesto z raztopino MTT v fazi inkubacije MTT, da se dobi kontrola z nespecifično barvo v živih tkivih ($NSC_{živo}$) (34) (35). Kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$) je treba izvesti sočasno s preskušanjem obarvane preskusne kemikalije, v primeru večkratnega preskušanja pa je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv za vsak izvedeni preskus (pri vsaki ponovitvi) izvesti neodvisno kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{živo}$). Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT ($\%Viabilnost_{preskus}$), od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z gojiščem brez MTT, kar se izvede sočasno s preskusom, ki se popravlja ($\%NSC_{živo}$), tj. dejanska viabilnost tkiva = $[\%Viabilnost_{preskus}] - [\%NSC_{živo}]$.

38. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati v sveže pripravljeno raztopino MTT. Ustrezna količina preskusne kemikalije se doda v raztopino MTT in zmes se približno tri ure inkubira pri standardnih pogojih gojenja (glej dodatka III in IV) (34) (35). Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo (ali suspenzija pri netopnih preskusnih kemikalijah), obarva modro/vijolično, se šteje, da

▼M8

preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilnih konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar preskusno kemikalijo absorbirajo in zadržijo podobno kot živa tkiva. Odmrla tkiva za VRM1 se pripravijo z izpostavitvijo nizki temperaturi (‚odmrla zaradi zamrznitve'). Odmrla tkiva za VRM2 se pripravijo s podaljšano inkubacijo (npr. vsaj 24 ± 1 uro) v vodi, ki ji sledi hramba pri nizki temperaturi (‚odmrla v vodi'). Vsaka preskusna kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se opravi celoten postopek preskušanja za kontrolo z nespecifično redukcijo MTT (NSMTT) (34) (35). Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSMTT, ne glede na število izvedenih samostojnih preskusov/ponovitev. Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT (%$Viabilnost_{preskus}$), od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (%NSMTT), tj. dejanska viabilnost tkiva = [%$Viabilnost_{preskus}$] − [%NSMTT].

39. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 37) in neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 38), je poleg kontrol NSMTT in $NSC_{živo}$, opisanih v prejšnjih odstavkih, potreben tudi tretji niz kontrol pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v razponu 570 ± 30 nm (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira oceno njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 38. Zato je treba kot privzete uporabiti kontrole NSMTT skupaj s kontrolami $NSC_{živo}$. Preskusne kemikalije, za katere se izvedejo tako kontrole NSMTT kot kontrole $NSC_{živo}$, se lahko absorbirajo v živa in odmrla tkiva ter v njih zadržijo. Zato se v tem primeru s kontrolo NSMTT lahko ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi absorpcije in zadržanja preskusne kemikalije v odmrlih tkivih. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo $NSC_{živo}$ že popravi barvna interferenca, ki jo povzročata absorpcija in zadržanje preskusne kemikalije v živih tkivih. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSC_{odmrlo}) (glej dodatka III in IV) (34) (35). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se izvede celoten postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC_{odmrlo} ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji (%$Viabilnost_{preskus}$), od katerega se odštejeta %NSMTT in %$NSC_{živo}$, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (%NSC_{odmrlo}), tj. dejanska viabilnost tkiva = [%$Viabilnost_{preskus}$] − [%NSMTT] − [%$NSC_{živo}$] + [%NSC_{odmrlo}].

▼M8

40. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc poveča optična gostota (pri izvajanju meritev standardne absorbance) izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra ter da se lahko tudi zaradi nespecifične redukcije MTT poveča površina vrha formazana MTT (pri izvajanju meritev spektrofotometrije HPLC/UPLC) izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi je pomembno, da vsak laboratorij najprej določi razpon linearnosti optične gostote/površine vrha svojega spektrofotometra, npr. s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7), ki je na trgu na voljo npr. pri podjetju Sigma-Aldrich (kat. št. M2003), šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene.

41. Meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in preskusnih kemikalij, ki povzročajo barvno interferenco, ko zaznana interferenca z meritvijo formazana MTT ni premočna (tj. optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, so znotraj linearnega razpona spektrofotometra). Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo %NSMTT in/ali $\%NSC_{živo} \geq 60$ % (VRM1 in VRM2 za protokole za tekoče snovi) ali 50 % negativne kontrole (VRM2 za protokole za trdne snovi), obravnavati previdno, saj je to določena mejna vrednost, ki se uporablja pri VRM za razlikovanje med razvrščenimi in nerazvrščenimi kemikalijami (glej odstavek 44). Vendar standardne absorbance (OD) ni mogoče meriti, kadar je interferenca z meritvijo formazana MTT premočna (tj. povzroča nepopravljene OD izvlečkov preskusnih tkiv, ki presegajo linearni razpon spektrofotometra). Obarvane preskusne kemikalije ali preskusne kemikalije, ki se obarvajo ob stiku z vodo ali izopropanolom, ki premočno vplivajo na meritev standardne absorbance (OD) formazana MTT, se še vedno lahko ocenijo z uporabo spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej dodatka III in IV). Sistem HPLC/UPLC namreč omogoča, da se formazan MTT pred kvantifikacijo loči od kemikalije (36). Iz tega razloga kontrole $NSC_{živo}$ ali NSC_{odmrlo} pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT (z uporabo postopka, opisanega v odstavku 38). Kontrole NSMTT je treba uporabiti tudi pri preskusnih kemikalijah, katerih barva (njihova lastna ali tista, ki se pojavi, ko je preskusna kemikalija v vodi) ovira oceno njihove sposobnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisano v odstavku 38. Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot: $\%Viabilnost_{preskus}$ minus %NSMTT, kot je opisano v zadnjem stavku odstavka 38. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, ali snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter po tretiranju ostanejo v tkivih in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušenih izvlečkov tkiv, ki presegajo linearni razpon spektrofotometra, s preskusnimi metodami rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

42. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko za merjenje formazana MTT uporabi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) (11) (36). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC ni mogoče, da bi vsak uporabnik določil popolnoma enake sistemske pogoje. Tako je treba ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati

▼M8

pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo v zvezi z bioanalitično metodo validacije (36) (38). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 5. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 5, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

Merila za sprejemljivost

43. Za vsako ponovitev, pri kateri se uporabljajo serije konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, ki ustrezajo kontroli kakovosti (glej odstavek 30), morajo tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo, izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, pri katerih so se upoštevale zahtevane stopnje in vsi postopki protokola, ter ne smejo biti zunaj mej, določenih s preteklimi preskusi in opisanih v preglednici 2 (glej odstavek 26). Podobno morajo tkiva, tretirana s pozitivno kontrolno snovjo, tj. metilacetatom, imeti srednjo viabilnost < 50 % glede na negativno kontrolo pri VRM1 s protokolom za tekoče snovi ali protokolom za trdne snovi ter ≤ 30 % (protokol za tekoče snovi) ali ≤ 20 % (protokol za trdne snovi) glede na negativno kontrolo pri VRM2, s čimer kažejo sposobnost tkiv, da se odzovejo na dražilno preskusno kemikalijo v pogojih preskusne metode (34) (35). Variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi snovmi mora biti znotraj sprejemljivih mej (tj. razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiva mora biti manjša od 20 % oziroma standardni odklon med tremi ponovljenimi vzorci tkiv ne sme presegati 18 %). Če je negativna ali pozitivna kontrola, vključena v ponovitev, zunaj sprejemljivih razponov, se ponovitev šteje za‚neveljavno' in jo je treba ponoviti. Če je variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv s preskusno kemikalijo zunaj sprejemljivega razpona, je treba preskus šteti za‚neveljaven', preskusno kemikalijo pa je treba znova preskusiti.

Razlaga rezultatov in napovedni model

44. Vrednosti optične gostote/površine vrha, dobljene s ponovljenimi vzorci izvlečkov tkiv za vsako preskusno kemikalijo, je treba uporabiti za izračun povprečnega deleža viabilnosti tkiv (srednja vrednost med ponovljenimi vzorci tkiv), normaliziranega na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Mejna vrednost deleža viabilnosti tkiv za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP), je navedena v preglednici 4. Rezultate je torej treba razlagati, kot je navedeno v nadaljevanju.

— Za preskusno kemikalijo se šteje, da je ni treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN in uredbo CLP (brez kategorije), če je povprečni delež viabilnosti tkiv po izpostavljenosti in inkubaciji po izpostavljenosti večji od (>) določene mejne vrednosti deleža viabilnosti tkiv, kot je prikazano v preglednici 4. V tem primeru ni potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami.

▼M8

— Če povprečni delež viabilnosti tkiv po izpostavljenosti in inkubaciji po izpostavljenosti znaša manj ali enako (≤) kot določena mejna vrednost deleža viabilnosti tkiv, napoved ni mogoča, kot je prikazano v preglednici 4. V tem primeru je potrebno dodatno preskušanje z drugimi preskusnimi metodami, ker preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, kažejo določeno število lažno pozitivnih rezultatov (glej odstavka 14 in 15) in ne omogočajo razlikovanja med kategorijama 1 in 2 po GHS ZN in uredbi CLP (glej odstavek 17).

Preglednica 4

Napovedni modeli glede na razvrstitev po GHS ZN in uredbi CLP

VRM	Brez kategorije	Napoved ni mogoča
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (za oba protokola)	srednja viabilnost tkiv > 60 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (za protokol za tekoče snovi)	srednja viabilnost tkiv > 60 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (za protokol za trdne snovi)	srednja viabilnost tkiv > 50 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 50 %

45. Kadar je rezultat nedvoumen, bi moral za preskusno kemikalijo zadoščati en sam preskus, sestavljen iz vsaj dveh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni delež viabilnosti tkiv, enak 60 ± 5 % (VRM1 in VRM2 za protokol za tekoče snovi) ali 50 ± 5 % (VRM2 za protokol za trdne snovi), pa je morda treba izvesti še drug preskus in nato še tretjega, če rezultati prvih dveh preskusov niso skladni.

46. Za posamezne vrste zmesi se lahko uporabijo različne mejne vrednosti deleža viabilnosti, tako da se razlikuje med razvrščenimi in nerazvrščenimi preskusnimi kemikalijami, če je to ustrezno in utemeljeno, da se poveča splošna učinkovitost preskusne metode za zadevne vrste zmesi (glej odstavek 14). Primerjalne kemikalije so lahko primerne za ocenjevanje potenciala za hude poškodbe oči/draženje oči, ki ga imajo neznane preskusne kemikalije ali proizvodni razred, ali za ocenjevanje relativnega potenciala toksičnosti razvrščene kemikalije za oči v določenem razponu pozitivnih odzivov.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

47. Podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv v ponovitvi (npr. vrednosti optične gostote/površine vrha formazana MTT in podatke o izračunanem deležu viabilnosti tkiv za preskusno kemikalijo in kontrole ter končno napoved s preskusno metodo rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu) je treba v preglednici navesti za vsako preskusno kemikalijo, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih preskusov. Poleg tega je treba za vsako posamezno preskusno kemikalijo in kontrolo navesti povprečni delež viabilnosti tkiv in razliko v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv (če je n = 2 ponovljena vzorca tkiv) ali standardni odklon (če je n ≥ 3 ponovljeni vzorci tkiv). Morebitne opažene interference preskusne kemikalije pri meritvi formazana MTT z neposrednim zmanjšanjem MTT in/ali barvno interferenco je treba navesti za vsako preskušeno kemikalijo.

Poročilo o preskusu

48. V poročilu o preskusu je treba navesti informacije, kot so predstavljene v nadaljevanju.

▼**M8**

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine

— Kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, LogP, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi

— Čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

— agregatno stanje in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Pozitivne in negativne kontrolne snovi

— Kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— agregatno stanje, hlapnost, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev uporabe druge negativne kontrole in ne ultra čiste H2O ali DPBS brez Ca 2+/Mg2+, če je ustrezno;

— utemeljitev uporabe druge pozitivne kontrole in ne metilacetata, če je ustrezno;

— sklicevanje na rezultate pozitivnih in negativnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev.

Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju

— Ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije.

— *Uporabljena konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, in protokol (z navedbo utemeljitve izbire, če je ustrezno)*

▼**M8**

Pogoji preskusne metode

— Uporabljena konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, vključno s številko serije;

— valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljata za kvantifikacijo formazana MTT, ter linearni razpon merilne naprave (npr. spektrofotometra);

— opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;

— opis uporabljenega sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno;

— popolne informacije v podporo specifični uporabljeni konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, vključno z njeno učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:

  i) kontrolo kakovosti viabilnosti (dobavitelj);

  ii) viabilnost v pogojih preskusne metode (uporabnik);

  iii) kontrolo kakovosti pregradne funkcije;

  iv) morfologijo, če je na voljo;

  v) obnovljivost in napovedljivost;

  vi) druge kontrole kakovosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, če so na voljo;

— navedbe podatkov o konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, pridobljene s preteklimi preskusi. To mora med drugim vključevati: sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;

— izjava, da je preskusni laboratorij s preskušanjem kemikalij za preverjanje usposobljenosti dokazal usposobljenost za uporabo preskusne metode pred redno uporabo.

Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa

— Srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;

— sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;

— sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

Preskusni postopek

— Podrobni podatki o uporabljenem preskusnem postopku;

— uporabljeni odmerki preskusne kemikalije in kontrolnih snovi;

— trajanje in temperatura izpostavljenosti, potopitve po izpostavljenosti in obdobij inkubacije po izpostavljenosti (če je ustrezno);

— opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;

▼M8

— navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;

— število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola, NSMTT, $NSC_{živo}$ in NSC_{odmrlo}, če je ustrezno).

Rezultati

— Preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah in kontrolnih snoveh za vsako ponovitev (vključno s ponovljenimi poskusi, če je ustrezno) in vsako ponovljeno meritev, vključno z vrednostjo optične gostote in površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv, razliko med ponovljenimi vzorci tkiv ali standardnimi odkloni, in končna napoved;

— če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali obarvane preskusne kemikalije, vključno z vrednostjo optične gostote ali površino vrha formazana MTT, %NSMTT, $\%NSC_{živo}$, $\%NSC_{odmrlo}$, razliko med ponovljenimi vzorci tkiv ali standardnim odklonom, končnim pravilnim deležem viabilnosti tkiv, in končna napoved;

— rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi snovmi glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;

— opis drugih opaženih učinkov, npr. obarvanja tkiv z obarvano preskusno kemikalijo.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) ZN (2015). Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, šesta revidirana izdaja, New York in Ženeva: Združeni narodi. Na voljo na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.

(3) Poglavje B.47 te priloge: Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.

(4) Poglavje B.48 te priloge: Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti.

(5) Poglavje B.61 te priloge: Preskusna metoda uhajanja fluoresceina za opredeljevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči.

▼**M8**

(6) Poglavje B.68 te priloge: *In vitro* preskusna metoda kratkotrajne izpostavljenosti za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.

(7) Freeman, S. J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261–266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Na voljo na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. Mnenje ESAC št. 2014-03 z dne 17. novembra 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Na voljo na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M. H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C. S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43–53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M. H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C. J., Toner, F., Roper, C. S., Van Rompay, A. R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55–70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Mnenje ESAC št. 2016-02 z dne 24. junija 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Na voljo na: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Rokopis v pripravi).

(14) Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377–390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment (št. 216): Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment (št. 34): Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., in Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339–364.

(20) Nguyen, D. H., Beuerman, R. W., De Wever, B., in Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. V: Salem, H., Katz, S. A. (ur.). Alternative Toxicological Methods, CRC Press, str. 147–159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., in Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619–626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., in McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476–1488.

(23) Kolle, S. N., Moreno, M. C. R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., in Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1–18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., in Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701–723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Templier, M., in McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521–547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., in Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113–126.

▼**M8**

(27) Hackett, R. B., in McDonald, T. O. (1991). Eye Irritation. V: *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology,* Marzulli, F. N., in Maibach, H. I. (ur.). 4. izdaja, str. 749–815. Washington, DC, ZDA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D. A., in Boyes, W. K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. V: Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Klaassen, C. D. (ur.). 7. izdaja, str. 665–697. Withby, ON, Kanada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J. V., Li, H. F., Petroll, W. M., Parker, R. D., Cavanagh, H. D., Carr, G. J., Smith, B., in Maurer, J. K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J. K., Parker, R. D., in Jester, J. V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106–117.

(31) Jester, J. V., Li, L., Molai, A., in Maurer, J. K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J. V., Petroll, W. M., Bean, J., Parker, R. D., Carr, G. J., Cavanagh, H. D., in Maurer, J. K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J. V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, različica 8 (5. marec 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Na voljo na: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, različica 1. (20. julij 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Na voljo na: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., in McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741–761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., in Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101–127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Na voljo na: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment (št. 263). ENV Publications, Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (18).

Primerjalna kemikalija: kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir za njeno opredelitev in določitev lastnosti; (ii) je strukturno, funkcijsko in/ali kemijsko podobna kemikalijam, ki se preskušajo, ali spada v podoben kemijski razred; (iii) ima znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu želenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve in označevanja glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve ali označevanja (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Skladnost: glej „točnost“.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

KV: koeficient variacije.

Dev.: odklon.

EIT: preskus draženja oči.

EURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih).

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in „kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP“.

ET_{50}: čas izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti tkiv za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije.

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih snovi, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih snovi, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

▼M8

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

IC_{50}: koncentracija, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti (npr. 30-minutnem tretiranju s SDS) zmanjša viabilnost tkiv za 50 %.

Prevelik odmerek: količina na konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, nanesene preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine epitelija.

Nepopravljivi učinki na oči: glej „Huda poškodba oči“.

LLOQ: spodnja meja določljivosti.

LogP: logaritem porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid.

Negativna kontrola: vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da ne povzroči pozitivnega odziva v preskusnem sistemu. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci ter uporabi za določitev 100-odstotne viabilnosti tkiv.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP, kategorija 2A ali 2B po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP). Ta pojem je sopomenka za „brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP“.

NSC_{odmrlo}: nespecifična barva v odmrlih tkivih.

$NSC_{živo}$: nespecifična barva v živih tkivih.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT.

OD: optična gostota.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi, ki se je štela za znanstveno veljavno, in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter ter (iii) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (18).

▼**M8**

Pozitivna kontrola: vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv v preskusnem sistemu. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (18).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (18).

Nadomestni preskus: preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja, ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot je ustrezno (18).

Obnovljivost: ujemanje rezultatov, pridobljenih s preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej „Zanesljivost“) (18).

Popravljivi učinki na oči: glej „Draženje oči“.

RhCE: rekonstruiran epitelij, podoben človeškemu roženičnemu.

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušenih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

SO: standardni odklon.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (18).

▼M8

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne snovi na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljena v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in „kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi LP“.

Standardni delovni postopki: formalni pisni postopki, ki podrobno opisujejo, kako je treba izvesti posamezne rutinske in s preskusom povezane laboratorijske postopke. Zahtevajo se z dobro laboratorijsko prakso.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (18).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskus: sočasno preskušanje iste preskusne kemikalije na vsaj dveh ponovljenih vzorcih tkiv, kot je opredeljeno v zadevnem standardnem delovnem postopku.

Viabilnost tkiv: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije v rekonstruiranem tkivu kot njihove zmožnosti za redukcijo vitalnega barvila MTT, ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo živih celic.

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjska strategija preskušanja, pri kateri se preskusne metode uporabijo zaporedoma. Na vsaki stopnji se pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial nevarnosti/jakost, dodatno preskušanje ni potrebno (18).

ULOQ: zgornja meja določljivosti.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

Kategorija 1 po GHS ZN in uredbi CLP: glej „Huda poškodba oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN in uredbi CLP: glej „Draženje oči“.

Brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP: kemikalije, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 po GHS ZN/uredbi CLP (ali kategorijo 2A ali 2B po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za „brez razvrstitve“.

UPLC: tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

▼**M8**

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljavna preskusna metoda: preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (18).

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (18).

VRM: validirana referenčna metoda.

VRM1: Kot validirana referenčna metoda 1 je naveden EpiOcular™ EIT.

VRM2: Kot validirana referenčna metoda 2 je naveden SkinEthic™ HCE EIT.

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti preskusne snovi.

▼M8

Dodatek 2

GLAVNI ELEMENTI PRESKUSOV REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU (RHCE), VALIDIRANIH ZA OPREDELITEV KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokoli	Tekoče snovi (ki jih je mogoče odmeriti s pipeto pri 37 ± 1 °C ali nižjih temperaturah za 15 min)	Trdne snovi (ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto)	Tekoče in viskozne snovi (ki jih je mogoče odmeriti s pipeto)	Trdne snovi (ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto)
Površina modela	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Število ponovljenih vzorcev tkiv	vsaj 2	vsaj 2	vsaj 2	vsaj 2
Predhodno preverjanjebarvne interference	50 µl + 1 ml H_2O za 60 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost (neobarvane preskusne kemikalije) ali 50 µl + 2 ml izopropanola, ki se 2–3 ure meša pri sobni temperaturi (obarvane preskusne kemikalije) → če je optična gostota preskusne kemikalije pri 570 ± 20 nm, potem ko se odšteje optična gostota izopropanola ali vode, > 0,08 (kar ustreza približno 5 % srednje optične gostote negativne kontrole), je treba izvesti žive prilagojene kontrole.	50 mg + 1 ml H_2O za 60 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost (neobarvane preskusne kemikalije) in/ali 50 mg + 2 ml izopropanola, ki se 2–3 meša ure pri sobni temperaturi (obarvane in neobarvane preskusne kemikalije) → če je optična gostota preskusne kemikalije pri 570 ± 20 nm, potem ko se odšteje optična gostota izopropanola ali vode, > 0,08 (kar ustreza približno 5 % srednje optične gostote negativne kontrole), je treba izvesti žive prilagojene kontrole.	10 µl + 90 µl H_2O se mešata 30 ± 2 min pri sobni temperaturi (18–28 °C) → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti žive prilagojene kontrole.	10 mg + 90 µl H_2O se mešata 30 ± 2 min pri sobni temperaturi → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti žive prilagojene kontrole.

▼M8

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Predhodno preverjanje neposredne redukcije MTT	50 µl + 1 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi zaradi zamrznitve (za negativno kontrolo se uporabi 50 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).	50 mg + 1 ml raztopine MTT s koncentracijo1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi zaradi zamrznitve (za negativno kontrolo se uporabi 50 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).	30 µl + 300 µl raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi v vodi (za negativno kontrolo se uporabi 30 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).	30 mg + 300 µl raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrlimi v vodi (za negativno kontrolo se uporabi 30 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).
Predhodno tretiranje	20 µl DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+} za 30 ± 2 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost, zaščiteno pred svetlobo.	20 µl DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+} za 30 ± 2 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost, zaščiteno pred svetlobo.	–	–
Odmerki pri tretiranju in nanos	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) z uporabo umerjenega orodja (npr. do roba polna žlička, umerjena tako, da drži 50 mg natrijevega klorida).	10 µl DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Za viskozne snovi uporabite najlonsko mrežico.	30 µl DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Izpostavljenostin temperatura izpostavljenosti	30 min (± 2 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	6 ur (± 0,25 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	30 min (± 2 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	4 ure (± 0,1 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost
Spiranje pri sobni temperaturi	trikrat v 100 ml DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}	trikrat v 100 ml DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+}
Potopitev po izpostavljenosti	12 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču	25 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču	30 min (± 2 min) pri 37 °C, 5 % CO_2, 95-odstotni relativni vlažnosti v gojišču	30 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču

▼M8

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Inkubacija po izpostavljenosti	120 min (± 15 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	18 ur (± 0,25 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	brez	18 ur (± 0,5 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost
Negativna kontrola	50 µl H_2O preskušeno sočasno	50 µl H_2O preskušeno sočasno	30 ± 2µl DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+} preskušeno sočasno	30 ± 2µl DPBS brez Ca^{2+}/Mg^{2+} preskušeno sočasno
Pozitivna kontrola	50 µl metilacetata preskušeno sočasno	50 µl metilacetata preskušeno sočasno	30 ± 2µl metilacetata preskušeno sočasno	30 ± 2µl metilacetata preskušeno sočasno
Raztopina MTT	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml
Inkubacija MTT in temperatura inkubacije MTT	180 min (± 15 min) pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	180 min (± 15 min) pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	180 min (± 15 min) pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	180 min (± 15 min) pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost
Ekstrakcijsko topilo	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka s prebadanjem tkiva)	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz spodnjega dela vstavka s prebadanjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz spodnjega dela vstavka)
Čas in temperatura ekstrakcije	2–3 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali čez noč pri 4–10 °C	2–3 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali čez noč pri 4–10 °C	4 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali vsaj čez noč brez stresanja pri 4–10 °C	vsaj 2 uri s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi
Odčitek optične gostote	570 nm (550–590 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (550–590 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra
Kontrola kakovosti tkiva	tretiranje s 100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. % 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	tretiranje s 100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. % 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30-minutno tretiranje s SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30-minutno tretiranje s SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

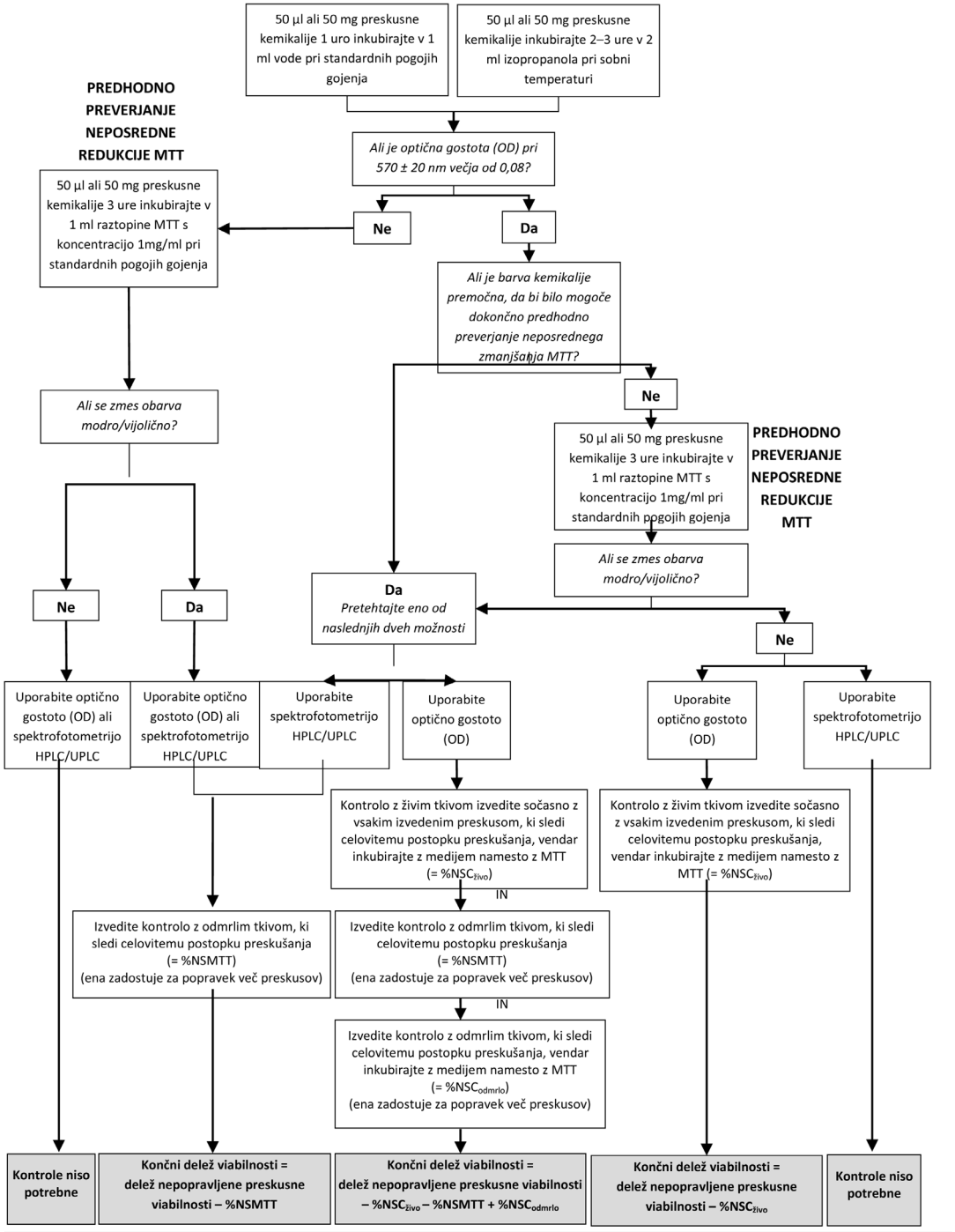
▼M8

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Merila za sprejemljivost	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti > 0,8 in < 2,5. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 30 minut izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti < 50 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti > 0,8 in < 2,5. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 6 ur izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti < 50 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti > 1,0 in ≤ 2,5. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 30 minut izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti ≤ 30 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti > 1,0 in ≤ 2,5. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 4 ure izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti ≤ 20 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.

▼**M8**

Dodatek 3

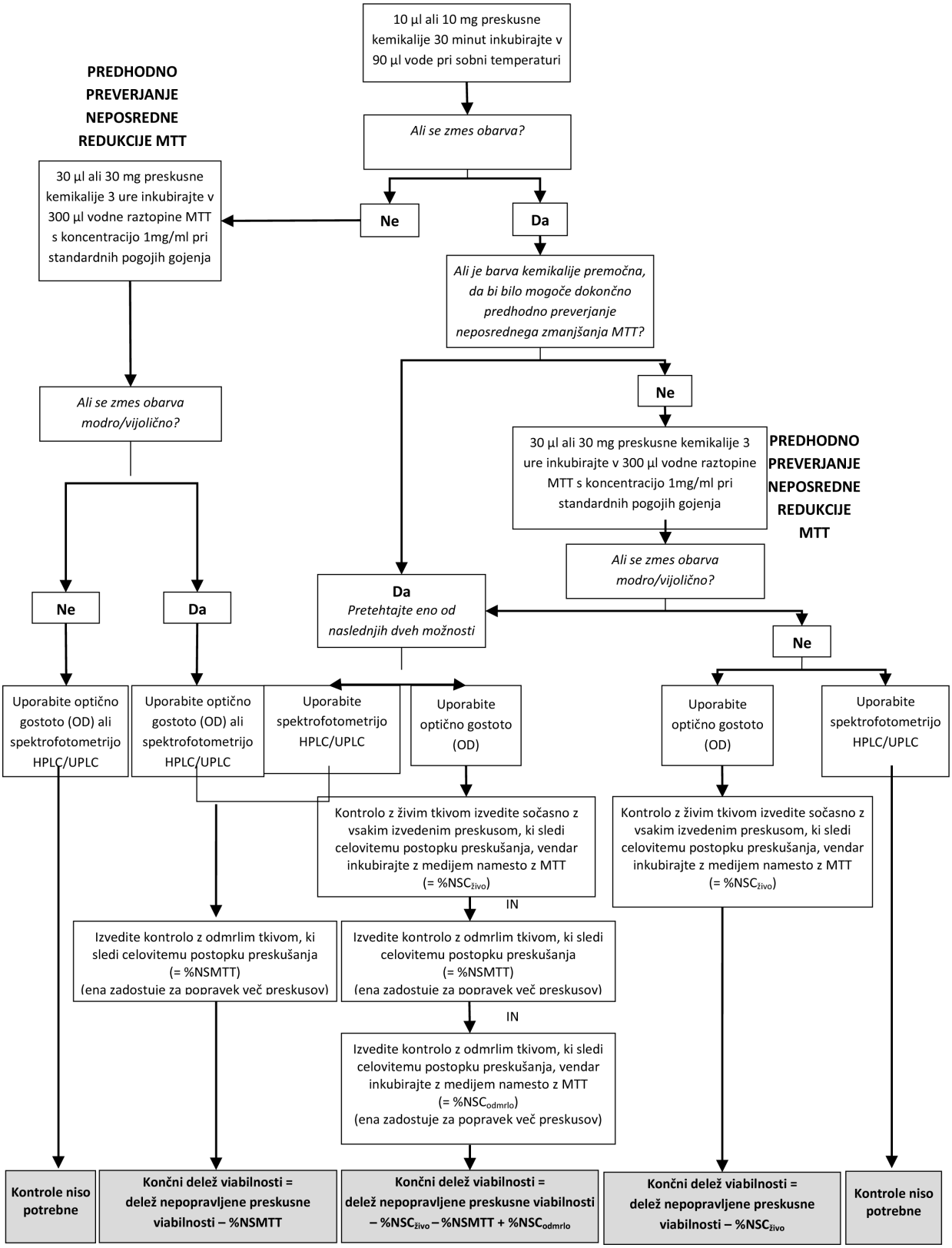
PONAZORITVENI SHEMATSKI PRIKAZ Z NAVODILI O TEM, KAKO OPREDELITI IN OBRAVNAVATI SNOVI, KI NEPOSREDNO ZMANJŠUJEJO MTT, IN/ALI KEMIKALIJE, KI POVZROČAJO BARVNO INTERFERENCO, NA PODLAGI STANDARDNEGA DELOVNEGA POSTOPKA ZA VRM1



▼M8

Dodatek 4

PONAZORITVENI SHEMATSKI PRIKAZ Z NAVODILI O TEM, KAKO OPREDELITI IN OBRAVNAVATI SNOVI, KI NEPOSREDNO ZMANJŠUJEJO MTT, IN/ALI KEMIKALIJE, KI POVZROČAJO BARVNO INTERFERENCO, NA PODLAGI STANDARDNEGA DELOVNEGA POSTOPKA ZA VRM2



▼**M8**

Dodatek 5

KLJUČNI PARAMETRI IN MERILA ZA SPREJEMLJIVOST ZA USTREZNOST SISTEMA SPEKTROFOTOMETRIJE HPLC/UPLC ZA MERJENJE FORMAZANA MTT, EKSTRAHIRANEGA IZ KONSTRUKCIJ TKIVA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (36) (38)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvlečka izopropanola iz živih konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvlečka izopropanola iz odmrlih konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, brez kakršnega koli tretiranja) in barvila (npr. metilen modrega).	$Površina_{interferenca} \leq 20$ % $površine_{LLOQ}$ (1).
Natančnost	Kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 μg/ml, 16 μg/ml in 160 μg/ml) v izopropanolu (n = 5).	KV ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	% Dev ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	85 % ≤ % vpliva matriksa ≤ 115 %
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ (2).	$Površina_{interferenca} \leq 20$ % $površine_{LLOQ}$.
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 μg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: % Dev ≤ 15 % ali ≤ 20 % za LLOQ. Kontrole kakovosti: % Dev ≤ 15 % in KV ≤ 15 %.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	% Dev ≤ 15 %.
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri –20 °C.	% Dev ≤ 15 %.

(1) LLOQ: spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 μg/ml.

(2) ULOQ: zgornja meja določljivosti (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol (~ 70 μg/ml v VRM), tj. 200 μg/ml.

▼M8

B.70 *IN VITRO*PRESKUSI S ČLOVEŠKIMI REKOMBINANTNIMI ESTROGENSKIMI RECEPTORJI (hrER) ZA ZAZNAVO KEMIKALIJ Z VEZAVNO AFINITETO ZA ER

SPLOŠNI UVOD

Smernica OECD za preskušanje na podlagi učinkovitosti

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 493 (2015). Smernica za preskušanje 493 je smernica za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, opisuje pa metodologijo za *in vitro* preskuse s človeškimi rekombinantnimi receptorji za zaznavo snovi z afiniteto za vezavo na estrogenske receptorje (v nadaljnjem besedilu: preskusi vezave na hrER). Vključuje dva mehanistično in funkcionalno podobna preskusa za opredelitev snovi, ki se vežejo na estrogenske receptorje (tj. ERα), ter naj bi olajšala razvoj novih podobnih ali prilagojenih preskusov v skladu z načeli za validacijo, določenimi v Smernici OECD za validacijo in mednarodno priznanje novih ali posodobljenih preskusnih metod za oceno tveganj (1). Popolnoma validirani referenčni preskusni metodi (Dodatek 2 in Dodatek 3), ki sta podlaga za to smernico za preskušanje na podlagi učinkovitosti, sta:

   — Freyberger-Wilsonov (FW) preskus vezave na estrogenske receptorje (ER) *in vitro*, pri katerem se uporablja celotni človeški rekombinantni ERα (2), ter

   — preskus vezave na estrogenske receptorje *in vitro* z uporabo rekombinantnega človeškega proteina z domeno za vezavo ligandov inštituta CERI (Chemical Evaluation and Research Institute) (2).

   Na voljo so standardi izvajanja (3), da se olajšata razvoj in validacija podobnih preskusnih metod za isto končno točko nevarnosti ter omogoči pravočasna sprememba na učinkovitosti temelječe Smernice za preskušanje 493, tako da se lahko posodobljeni smernici za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, dodajo novi podobni preskusi. Vendar bodo podobni preskusi dodani šele, ko jih bo OECD pregledala in potrdila, da so v skladu s standardi izvajanja. Preskusi, vključeni v Smernico za preskušanje 493, se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav članic OECD po rezultatih preskusov v zvezi z vezavo na estrogenske receptorje, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

Ozadje in načela preskusov, vključenih v to preskusno metodo

2. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje, je bil revidiran leta 2012. Prvotni in revidirani temeljni okvir sta kot prilogi vključena v Smernice za standardizirane smernice za preskušanje za ocenjevanje kemikalij glede lastnosti endokrinih motilcev (4). Temeljni okvir zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza posamezni stopnji biološke kompleksnosti. Preskusi vezave na estrogenske receptorje, opisani v tej preskusni metodi, so raven 2, ki vključuje „preskuse *in vitro*, ki zagotavljajo podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh“. Ta preskusna metoda je za *in vitro* preskuse vezave na receptorje, s katerimi se opredelijo ligandi za človeški estrogenski receptor alfa (ERα).

▼**M8**

3. Ustreznost *in vitro* preskusa vezave na ER za biološke funkcije je bila jasno dokazana. Preskusi vezave na ER so zasnovani, da se opredelijo kemikalije, ki bi lahko zmotile pot hormona estrogena, pri čemer so se v zadnjih dveh desetletjih obširno uporabljali za opredelitev porazdelitve ER v tkivih ter opredelitev agonistov/antagonistov ER. V teh preskusih se kaže interakcija ligand-receptor, ki je začetna faza estrogenske signalne poti in nujna za razmnoževalno funkcijo pri vseh vretenčarjih.

4. Interakcija med estrogeni in ER lahko vpliva na transkripcijo genov, ki jih nadzoruje estrogen, in povzroči negenomske učinke, kar lahko povzroči indukcijo ali inhibicijo celičnih procesov, vključno s tistimi, ki so nujni za celično proliferacijo, normalen razvoj zarodka in razmnoževalno funkcijo (5) (6) (7). Motnja normalnih estrogenskih sistemov ima lahko škodljive učinke na normalen razvoj (ontogenezo), reproduktivno zdravje in celovitost razmnoževalnega sistema. Nepravilno signaliziranje ER ima lahko učinke, kot so povečano tveganje za hormonsko odvisnega raka, zmanjšana plodnost ter spremembe v rasti in razvoju ploda (8).

5. Preskusi vezave *in vitro* temeljijo na neposredni interakciji snovi s specifičnim vezavnim mestom za ligande na receptorju, ki uravnava gensko transkripcijo. Ključni element preskusa s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem alfa (hrERα) meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([^{3}H]17β-estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand ter dokumentiranja specifičnosti ER, ki mu sledi poskus kompetitivne vezave, za katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.

6. Z validacijskimi študijami preskusov vezave inštituta CERI in FW sta bili dokazani njuna ustreznost in zanesljivost za predvideni namen (2).

7. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

Obseg in omejitve preskusov vezave na receptorje

8. Ti preskusi so predlagani za namene presejanja in prednostnega razvrščanja, lahko pa zagotovijo tudi podatke za molekularni sprožitveni dogodek, ki se lahko uporabijo pri pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Z njimi se obravnava vezava kemikalije na domeno za vezavo liganda na ERα v sistemu *in vitro*. Tako se rezultati ne smejo neposredno ekstrapolirati na kompleksno signaliziranje in uravnavanje nedotaknjenega endokrinega sistema *in vivo*.

▼**M8**

9. Vezava naravnega liganda, 17β-estradiola, je prva faza v nizu molekularnih dogodkov, ki sproži transkripcijo tarčnih genov in nazadnje doseže vrh s fiziološko spremembo (9). Tako se vezava na domeno za vezavo liganda na ERα šteje za enega od ključnih mehanizmov z ER povzročenih motenj endokrinega sistema, čeprav obstajajo še drugi mehanizmi, prek katerih lahko pride do takih motenj, vključno z (i) interakcijami z drugimi mesti ERα, ki niso žep za vezavo liganda, (ii) interakcijami z drugimi receptorji, pomembnimi za estrogensko signaliziranje, ERβ in estrogenskim receptorjem, sklopljenim s proteinom G, drugimi receptorji in encimskimi sistemi znotraj endokrinega sistema, (iii) sintezo hormonov, (iv) presnovno aktivacijo in/ali inaktivacijo hormonov, (v) porazdelitvijo hormonov v ciljna tkiva in (vi) očistkom hormonov iz telesa. Ti načini delovanja se ne obravnavajo z nobenim od preskusov v okviru te preskusne metode.

10. S to preskusno metodo se obravnava zmožnost snovi, da se vežejo na človeški ERα, in ne razlikuje med agonisti ali antagonisti ERα. Prav tako se s temi preskusi ne obravnavajo niti nadaljnji sledeči dogodki, kot so genska transkripcija ali fiziološke spremembe. Glede na to, da so bile med validacijo uporabljene samo posamezne snovi iz ene sestavine, uporaba za preskušanje zmesi ni bila obravnavana. Ne glede na to so preskusi teoretično ustrezni za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

11. Brezcelični receptorski sistemi nimajo endogene presnovne zmogljivosti in niso bili validirani v povezavi z encimskimi presnovnimi sistemi. Kljub temu bi bilo mogoče presnovno aktivnost vključiti v zasnovo študije, vendar bi bilo za to potrebno dodatno validacijsko delo.

12. Kemikalije, ki lahko denaturirajo protein (tj. receptorski protein), kot so površinsko aktivne snovi, ali kemikalije, ki lahko spremenijo pH analiznega pufra, se ne smejo preskušati oziroma se lahko preskušajo samo pri koncentracijah, ki ne povzročajo takih interakcij. Sicer pa je območje koncentracije, ki se lahko preskusi pri preskusih s preskusno kemikalijo, omejeno z njeno topnostjo v analiznem pufru.

13. Informativno so v preglednici 1 navedeni rezultati preskusov za 24 snovi, ki so bile preskušene v obeh v celoti validiranih preskusih, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi jih je na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za transkripcijsko aktivacijo ER in/ali uterotropni preskus (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15), 17 razvrščenih med snovi, ki se vežejo na ER, 6 pa med snovi, ki se ne vežejo. V zvezi s podatki, povzetimi v preglednici 1, je obstajalo skoraj 100-odstotno ujemanje med obema preskusoma v zvezi z razvrščanjem vseh snovi do 10^{-4} M, vse snovi pa so bile pravilno razvrščene med snovi, ki se vežejo na ER, ali snovi, ki se ne vežejo. Dodatne informacije o tej skupini snovi in dodatnih snoveh, preskušenih v preskusih vezave na ER med validacijskimi študijami, so na voljo v standardih izvajanja za preskus vezave s človeškim rekombinantnim endogenskim receptorjem (3), Dodatek 2 (preglednice 1, 2 in 3).

▼M8

Preglednica 1

Razvrstitev snovi med snovi, ki se vežejo na ER, ali snovi, ki se ne vežejo, pri preskusih vezave s človeškim rekombinantnim endogenim receptorjem FW in CERI skupaj s primerjavo s pričakovanim odzivom

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERI		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
1	17β-Estradiol	50-28-2	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
2	Noretinodrel	68-23-5	*snov, ki se veže*	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
3	Noretindron	68-22-4	*snov, ki se veže*	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
4	Di-n-butil ftalat	84-74-2	*snov, ki se ne veže* (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže (**) (†)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže (**) (†)	ogljikovodik (ciklični), ester	mehčalo, kemijski vmesni produkt
5	DES	56-53-1	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Mezo-heksestrol	84-16-2	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
8	Genistein	446-72-0	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (heterociklični), flavonoid	naravni produkt

▼M8

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERI		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
9	Ekvol	531-95-3	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	fitoestrogenski metabolit	naravni produkt
10	Butil paraben (*n* butil-4-hidroksibenzoat)	94-26-8	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	paraben	konzervans
11	Nonilfenol (zmes)	84852-15-3	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	alkilfenol	vmesna spojina
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	organoklorin	insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	*snov, ki se ne veže* (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	steroid	naravni produkt
14	Zearalenon	17924-92-4	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (heterociklični), lakton	naravni produkt
15	Tamoksifen	10540-29-1	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
16	5α-dihidrotestosteron	521-18-6	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	steroid, nefenolni	naravni produkt
17	Bisfenol A	80-05-7	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	fenol	kemijski vmesni produkt
18	4-*n*-heptilfenol	1987-50-4	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	dvoumno ([a])	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	alkilfenol	vmesni produkt

▼M8

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERI		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (halogenirani)	pesticid
20	Benz(a)antracen	56-55-3	*snov, ki se ne veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže ([b])	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže ([b])	aromatski ogljikovodik	vmesni produkt
21	Enterolakton	78473-71-9	*snov, ki se veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	fitoestrogen	naravni produkt
22	Progesteron	57-83-0	*snov, ki se ne veže* (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	steroid	naravni produkt
23	Oktiltrietoksisilan	2943-75-1	*snov, ki se ne veže*	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže	silan	površinski modifikator
24	Atrazin	1912-24-9	*snov, ki se ne veže* (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	heterociklična spojina	herbicid

(*) Meja topnosti $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Uporaba in razvrstitev di-n-butil ftalata (DBP) kot snovi, ki se ne veže, sta temeljili na preskušanju do 10^{-4} M, ker je bilo med predvalidacijskimi študijami v nekaterih laboratorijih ugotovljeno, da snov ni topna pri 10^{-3} M (npr. motnost).

([†]) Med validacijsko študijo je bil di-*n*-butil ftalat (DBP) preskušen kot šifrirana preskusna snov s koncentracijami do 10^{-3} M. V teh pogojih so nekateri laboratoriji opazili zmanjšanje vezave radioaktivno označenih ligandov pri najvišji koncentraciji (10^{-3}M) in/ali dvoumno prileganje krivulje. Za te ponovitve je bil DBP razvrščen kot „dvoumen“ ali „snov, ki se veže“ v 3/5 laboratorijev, ki so uporabili preskus CERI, in 5/6 laboratorijev, ki so uporabili preskus FW (glej vir (2), oddelka IV.B.3a,b in VI.A).

([a]) Razvrstitev se ni ujemala s pričakovano razvrstitvijo. Zaradi razvrstitve 4-*n*-heptilfenola kot „dvoumnega“ ali „snovi, ki se ne veže,“ v 3/5 laboratorijev je bila povprečna razvrstitev razvrstitev med dvoumne snovi. Natančnejši pregled je razkril, da je bilo to posledica omejitev topnosti kemikalije, zaradi katerih ni bilo mogoče dobiti popolne krivulje vezave.

([b]) Med validacijsko študijo je bil benz(a)antracen razvrščen kot snov, ki se ne veže (tj. negativna), in sicer na podlagi objavljenih virov, ki dokazujejo, da je estrogeno delovanje te snovi *in vitro* (16) predvsem odvisno od njene presnovne aktivacije(17)(18). Encimska presnovna aktivacija snovi ne bi bila pričakovana v brezceličnih preskusih vezave s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem, kot so bili uporabljeni v tej validacijski študiji med laboratoriji. Tako je pravilna razvrstitev te snovi med „snovi, ki se ne vežejo“, če se uporablja v preskusnih pogojih za preskusa FW in CERI.

▼M8

ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE S ČLOVEŠKIM REKOMBINANTNIM ESTROGENSKIM RECEPTORJEM (HRER)

Nujni elementi preskusa

14. Ta preskusna metoda se uporablja za preskuse, pri katerih se uporabljata receptor ER in primerno močan ligand na receptorju, ki se lahko uporabi kot označevalec/sledilo za preskus in se lahko premešča z naraščanjem koncentracij preskusne kemikalije. Preskusi vezave vsebujejo naslednja glavna elementa: (1) vezavo z nasičenjem in (2) kompetitivno vezavo. Preskus vezave z nasičenjem se uporablja za potrditev specifičnosti in aktivnosti receptorskih pripravkov, medtem ko se poskus s kompetitivno vezavo uporablja za oceno zmožnosti preskusne kemikalije, da se veže na človeški rekombinantni estrogenski receptor.

Kontrole

15. Opisati je treba podlago za predlagani sočasni referenčni estrogen in kontrole. Sočasne kontrole (topilo (vehikel), pozitivna (snov, ki se veže na ER; močna in šibka afiniteta), negativna (snov, ki se ne veže), kakor je ustrezno, se uporabljajo kot kazalnik, da preskus deluje v preskusnih pogojih, in zagotavljajo podlago za primerjave med poskusi; običajno spadajo med merila za sprejemljivost posameznega poskusa (1). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati: (1) visoko (približno polna premestitev radioaktivno označenega liganda) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (2) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah.

Standardni postopki kontrole kakovosti

16. Standardne postopke kontrole kakovosti je treba izvesti, kot je opisano za vsak preskus, za zagotovitev, da aktivni receptorji, pravilne koncentracije kemikalij, meje dovoljenega odstopanja ostanejo stabilni skozi več ponovitev in ohranijo sposobnost za zagotovitev pričakovanih odzivov vezave na ER v daljšem časovnem obdobju.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

17. Pred preskušanjem neznanih kemikalij s katerim od preskusov v okviru te preskusne metode mora vsak laboratorij dokazati usposobljenost za uporabo preskusa, tako da izvede preskuse z nasičenjem, da se potrdita specifičnost in aktivnost pripravka ER, in preskuse s kompetitivno vezavo z referenčnim estrogenom in kontrolami (snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov z rezultati za referenčni estrogen in kontrole, dobljenimi na podlagi 3–5 neodvisnih poskusov, izvedenih na različne dneve. Ti poskusi bodo za laboratorij podlaga za referenčni estrogen in kontrole iz preteklih preskusov ter bodo uporabljeni kot delna ocena sprejemljivosti preskusa za prihodnje ponovitve.

18. Odzivnost preskusnega sistema bo prav tako potrjena s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 2. Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti je podskupina referenčnih snovi, navedenih v standardih izvajanja za preskuse vezave na ER (3). Te snovi so na voljo na trgu, predstavljajo razrede kemikalij, ki se pogosto povezujejo z delovanjem vezave na ER, ter imajo primeren razpon jakosti, ki se pričakuje za snovi, ki se vežejo na ER (tj. močne do šibke), in snovi, ki se ne vežejo (tj. negativne snovi). Za vsako snov za preverjanje usposobljenosti morajo preskušene koncentracije zajemati razpon, naveden v preglednici 2. Za vsako snov je treba izvesti vsaj tri poskuse, rezultati pa morajo biti skladni s pričakovanim kemijskim delovanjem. Vsak poskus je treba izvesti neodvisno (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagenta) in s tremi ponovljenimi vzorci za vsako koncentracijo. Usposobljenost se dokaže s pravilno razvrstitvijo (pozitivna/negativna) vsake snovi za preverjanje usposobljenosti. Preverjanje usposobljenosti mora izvesti vsak tehnik, ko se uči preskusov.

▼M8

Preglednica 2

Seznam kontrol in snovi za preverjanje usposobljenosti za preskuse kompetitivne vezave na človeški rekombinantni estrogenski receptor ([1])

Št.	Ime snovi	Št. CAS ([2])	Pričakovani odziv ([3]) ([4])	Območje preskusnih koncentracij (M)	Kemijski razred po MeSH ([5])	Skupina proizvodov ([6])
Kontrole (referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, snov, ki se ne veže)						
1	17-εστραδιολ	50-28-2	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
2	Noretinodrel (ali) noretindron	68-23-5 (ali) 68-22-4	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-6}	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
3	Oktiltrietoksisilan	2943-75-1	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	silan	površinski modifikator
Snovi za preverjanje usposobljenosti ([6])						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Tamoksifen	10540-29-1	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
8	Genistein	446-72-0	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	heterociklična spojina, flavonoid	naravni produkt
9	Bisfenol A	80-05-7	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	fenol	kemijski vmesni produkt
10	Zearalenon	17924-92-4	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-3}	heterociklična spojina, lakton	naravni produkt

▼M8

Št.	Ime snovi	Št. CAS (2)	Pričakovani odziv (3) (4)	Območje preskusnih koncentracij (M)	Kemijski razred po MeSH (5)	Skupina proizvodov (6)
11	Butil paraben	94-26-8	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-3}	karboksilna kislina, fenol	konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	heterociklična spojina	herbicid
13	Di-n-butilftalat (DBP) (7)	84-74-2	snov, ki se ne veže (8)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	ogljikovodik (ciklični), ester	mehčalo, kemijski vmesni produkt
14	Kortikosteron	50-22-6	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-4}	steroid	naravni produkt

(1) Če snov za preverjanje usposobljenosti ni več na voljo na trgu, se lahko uporabi snov z enako razvrstitvijo vezave na ER, primerljivo jakostjo in kemijskim razredom.
(2) Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).
(3) Razvrstitev kot snov, ki se veže na ER, ali snov, ki se ne veže, med validacijsko študijo za preskusa vezave na človeški rekombinantni estrogenski receptor CERI in FW (2).
(4) Aktivnost vezave na ER je temeljila na dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave na ER in TA (9) ter na empiričnih podatkih in drugih informacijah, pridobljenih iz referenčnih študij, ki so bile objavljene in pregledane (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov produktov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) DBP se lahko uporabi kot nadomestna kontrolna snov, ki se ne veže, preskušena pri najvišji koncentraciji 10^{-4} M.
(8) Meja topnosti za to snov je 10^{-4} M. Uporaba in razvrstitev di-n-butil ftalata (DBP) kot snovi, ki se ne veže, sta temeljili na preskušanju do 10^{-4} M, ker je bilo med predvalidacijskimi študijami v nekaterih laboratorijih ugotovljeno, da snov ni topna pri 10^{-3} M (npr. motnost).

▼M8

Preskušanje topnosti in določanje območja koncentracije za preskusne kemikalije

19. Izvesti je treba predhodni preskus za določitev meje topnosti za vsako preskusno kemikalijo in za opredelitev ustreznega območja koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusa. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje za določanje območja sestavljajo kontrola s topilom in osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine. Koncentracije pri drugem in tretjem poskusu je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo.

Merila za sprejemljivost ponovitve preskusa

20. Sprejetje ali zavrnitev ponovitve preskusa temelji na oceni rezultatov, dobljenih za referenčni estrogen in kontrolo, uporabljeno za posamezni poskus. Najprej, za prvo ploščo morajo celotne krivulje koncentracije za referenčne kontrole iz vsakega poskusa ustrezati meritvam učinkovitosti s parametri prileganja krivulje (npr. IC_{50} in Hillov naklon) na podlagi rezultatov, sporočenih za zadevne protokole pri preskusih CERI in FW (dodatka 2 in 3), in podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov laboratorija, ki izvaja preskus. Vse kontrole (referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže) morajo biti za vsak poskus ustrezno razvrščene. Dalje, kontrole na vseh naslednjih ploščah je treba oceniti glede skladnosti s prvo ploščo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh krivulje kompetitivne vezave. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi neodvisnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Sposobnost doslednega izvajanja preskusa je treba dokazati z vzpostavitvijo in vzdrževanjem zbirke podatkov iz preteklih preskusov za referenčni estrogen in kontrole. Standardni odkloni ali koeficienti variacije za srednje vrednosti parametrov prileganja krivulj vezave na referenčni estrogen in kontrol s snovmi, ki se šibko vežejo, iz več poskusov se lahko uporabijo kot merilo za obnovljivost znotraj laboratorija. Pri pregledu rezultatov kontrole plošč iz vsake ponovitve in za vsako preskusno kemikalijo je treba uporabiti strokovno presojo.

Poleg tega je treba upoštevati naslednja načela v zvezi z merili za sprejemljivost:

— Podatki morajo zadostovati za kvantitativno oceno vezave na ER.

— Preskušene koncentracije morajo ostati znotraj razpona topnosti preskusne kemikalije.

Analiza podatkov

21. Opredeljeni postopek podatkovne analize za podatke o vezavi z nasičenjem in kompetitivni vezavi mora biti v skladu s ključnimi načeli za opredelitev interakcij receptor-ligand. Običajno se podatki o vezavi z nasičenjem analizirajo z uporabo modela nelinearne regresije, ki upošteva skupno in nespecifično vezavo. Pri določanju Bmax in Kd je morda potreben popravek zaradi izgube liganda (npr. Swillens, 1995 (19)). Podatki iz preskusov kompetitivne vezave se običajno pretvorijo (npr. delež specifične vezave in koncentracija preskusne kemikalije (log M)). Ocene logaritma (IC_{50}) za

▼M8

vsako preskusno kemikalijo je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulj, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi. Po začetni analizi je treba izpeljati parametre prileganja krivulj in vizualni pregled, kako dobro se podatki o vezavi prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave. V nekaterih primerih je za najboljše prileganje krivulje morda potrebna dodatna analiza (npr. z omejitvijo vrha in dna krivulje, uporabo pravila 10 %, glej Dodatek 4 in sklic 2 (oddelek III.A.2)).

22. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost (odstavek 20) kaže, da preskusni sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri posameznem preskusu dobljeni točni podatki. Najboljši znak, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitev pravilnih rezultatov prvega preskusa.

Splošna merila za razlago rezultatov

23. Trenutno ni splošno sprejete metode za razlago podatkov o vezavi na ER. Kljub temu morata kvalitativna (npr. snov, ki se veže/snov, ki se ne veže) in/ali kvantitativna (npr. log IC_{50}, relativna vezavna afiniteta (RBA) itd.) ocena s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem povzročene dejavnosti temeljiti na empiričnih podatkih in razumni znanstveni presoji.

Poročilo o preskusu

24. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskus:

— uporabljeni preskus.

Kontrolna/referenčna/preskusna kemikalija:

— vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

— stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;

— meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

▼**M8**

Topilo/vehikel:

— opredelitev lastnosti (narava, dobavitelj in serija);

— utemeljitev izbire topila/vehikla;

— topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana.

Receptorji:

— vir receptorjev (dobavitelj, kataloška št., serija, vrsta receptorja, koncentracija aktivnega receptorja, ki jo zagotavlja dobavitelj, potrdilo dobavitelja);

— opredelitev lastnosti receptorjev (vključno z rezultati vezave z nasičenjem): Kd, Bmax;

— hramba receptorjev;

— radioaktivno označen ligand:

— dobavitelj, kataloška št., serija, specifično delovanje.

Preskusni pogoji:

— omejitve topnosti v pogojih preskusa;

— sestava vezavnega pufra;

— koncentracija receptorja;

— koncentracija sledila (tj. radioaktivno označenega liganda);

— koncentracije preskusne kemikalije;

— delež vehikla v končnem preskusu;

— inkubacijska temperatura in čas trajanja inkubacije;

— metoda vezanega/prostega ločevanja;

— pozitivne in negativne kontrole/referenčne snovi;

— merila za določitev, ali je preskus pozitiven, negativen ali dvoumen.

Preverjanje sprejemljivosti:

— dejanske vrednosti IC_{50} in Hillovega naklona za sočasne pozitivne kontrole/referenčne snovi.

Rezultati:

— neobdelani in vezani/prosti podatki;

— preverjanje za potrditev denaturacije, če je ustrezno;

— najnižja efektivna koncentracija, če obstaja;

— vrednosti relativne vezavne afinitete in/ali IC_{50}, kot je ustrezno;

— razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

— statistične analize, če obstajajo, skupaj z meritvijo napake in zaupanja (npr. SEM, SD, CV ali 95 % CI) ter opisom, kako so bile te vrednosti dobljene.

▼**M8**

Razprava o rezultatih:

— uporaba pravila 10 %.

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 226), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 222), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(5) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: str. 20–6.

(6) Welboren, W. J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): str. 1073–89.

(7) Younes, M., in Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): str. 63–6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4): 293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (publikacija NIH št. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori, Y., *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225–231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 67), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. str. 1–188.

(15) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111–120.

(16) Kummer, V., Maskova, J., Zraly, Z., Neca, J., Simeckova, P., Vondracek, J., Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213–221.

(17) Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., Arcaro, K. F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58–67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835–848.

(19) Swillens, S. (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6): 1197–1203.

▼**M8**

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

Pravilo 10 %: možnost, da se iz analiz izključijo podatkovne točke, pri katerih je srednja vrednost ponovljenih vzorcev za delež specifične vezave [^{3}H]17β-estradiola najmanj 10 % nad opaženim deležem srednje vrednosti pri nižji koncentraciji (glej Dodatek 4).

Merila za sprejemljivost: minimalni standardi za učinkovitost poskusnih kontrol in referenčnih standardov. Da se poskus šteje za veljaven, morajo biti izpolnjena vsa merila za sprejemljivost.

Točnost (skladnost): stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz ‚skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (1).

TO: temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

Kemikalija: snov ali zmes.

KV: koeficient variacije.

E2: 17β-estradiol

ED: endokrina motnja.

hERα: človeški estrogenski receptor alfa.

ER: estrogenski receptor.

Estrogenska aktivnost: zmožnost kemikalije, da posnema 17β-estradiol, kar zadeva njegovo sposobnost vezave na estrogenske receptorje. Vezavo na hERα je mogoče zaznati s to preskusno metodo.

IC50: srednja efektivna koncentracija inhibitorne preskusne snovi.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod).

Obnovljivost med laboratoriji: merilo, v kakšnem obsegu lahko različni usposobljeni laboratoriji z uporabo istega protokola in preskušanjem istih snovi dobijo kvalitativno in kvantitativno podobne rezultate. Obnovljivost med laboratoriji se ugotovi med postopki pred validacijo in med njo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi obnovljivost v različnih laboratorijih (1).

Obnovljivost v laboratoriju: določitev, v kakšnem obsegu lahko usposobljene osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola ob različnih časih. Imenuje se tudi obnovljivost znotraj laboratorija (1).

LEC: najnižja efektivna koncentracija je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči odziv (tj. najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se razmerje indukcije statistično razlikuje od sočasne kontrole z vehiklom).

▼M8

Podoben preskus: pogovorni izraz za preskus, ki je strukturno in funkcionalno podoben validirani in sprejeti referenčni preskusni metodi. Uporablja se kot sopomenka za podobno preskusno metodo.

PBTG: smernica za preskušanje na podlagi učinkovitosti.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlaganega preskusa, ki je funkcijsko in mehanistično podoben. Vključujejo: (1) nujne elemente preskusa; (2) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (3) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagani preskus pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (1).

Snovi za preverjanje usposobljenosti: podskupina referenčnih snovi, vključenih v standarde izvajanja, ki jih lahko laboratoriji uporabijo za dokazovanje tehnične usposobljenosti za standardiziran preskus. Običajno so med merili za izbor teh snovi: da predstavljajo celoten razpon odzivov, da so na voljo na trgu in da so zanje na voljo visokokakovostni referenčni podatki.

Usposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno izvedbo preskusa pred preskušanjem neznanih snovi.

Referenčni estrogen: 17β-estradiol (E2, št. CAS 50-28-2).

Referenčne preskusne metode: preskusi, na katerih temelji PBTG 493.

RBA: relativna vezavna afiniteta. Relativna vezavna afiniteta snovi se izračuna kot delež logaritma (IC_{50}) za snov v razmerju do logaritma (IC_{50}) za 17β-estradiol.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni, v kakšnem obsegu se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (1).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih.

SO: standardni odklon.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Validirana preskusna metoda: preskus, za katerega sta bili na podlagi končanih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (1).

Validacija: postopek, s katerim se določita zanesljivost in ustreznost posameznega pristopa, metode, preskusa, postopka ali ocene za opredeljen namen (1).

▼**M8**

Dodatek 2

FREYBERGER-WILSONOVA IN VITRO PRESKUSA VEZAVE Z NASIČENJEM IN KOMPETITIVNE VEZAVE NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ERA) Z UPORABO CELOTNEGA REKOMBINANTNEGA ERA

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem *in vitro* preskusu vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave na estrogenski receptor (ERα) se uporablja celotni človeški receptor ERα (hrERα), ki nastane v celicah žuželk, okuženih z bakulovirusom, nato pa se iz njih izolira. Protokol, ki sta ga razvila Freyberger in Wilson, je bil predmet mednarodne validacijske študije, izvedene v več laboratorijih (2), ki je dokazala njegovo ustreznost in zanesljivost za predvideni namen preskusa.

2. Ta preskus je presejalni postopek za opredelitev snovi, ki se lahko vežejo na celotno hrERα. Uporablja se za določitev zmožnosti preskusne kemikalije, da tekmuje s 17β-estradiolom za vezavo na hrERα. Rezultati kvantitativne analize lahko vključujejo IC_{50} (merjenje koncentracije preskusne kemikalije, potrebne, da izpodrine polovico [^{3}H]-17β-estradiola z hrERα) in relativne vezavne afinitete preskusnih kemikalij za hrERα v primerjavi s 17β-estradiolom. Za namene presejanja kemikalij lahko sprejemljivi rezultati kvalitativne analize vključujejo razvrstitve preskusnih kemikalij kot snovi, ki se vežejo na hrERα, snovi, ki se ne vežejo, ali dvoumne snovi na podlagi meril, opisanih za krivulje vezave.

3. Pri preskusu se uporabi radioaktivno označen ligand, zaradi katerega laboratorij potrebuje dovoljenje za radioaktivne materiale. Vsi postopki z radioizotopi in nevarnimi kemikalijami morajo potekati v skladu s predpisi in postopki, kot so opisani v nacionalni zakonodaji.

4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka **„SPLOŠNI UVOD“** in **„ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER“**. Opredelitve in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 1.

NAČELA PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. S preskusom vezave na hrERα se meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([3H]17β-estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja.

6. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand in nato poskusa kompetitivne vezave ER, za katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.

7. Namen poskusa vezave z nasičenjem je opredeliti določeno serijo receptorjev za vezavno afiniteto in število vezav kot pripravo na poskus kompetitivne vezave. S poskusom vezave z nasičenjem se v pogojih stacionarnega stanja merita afiniteta stalne koncentracije estrogenskega receptorja do njegovega naravnega liganda (ki jo predstavlja disociacijska konstanta, Kd) in koncentracija aktivnih receptorskih mest (Bmax).

▼M8

8. S poskusom kompetitivne vezave se meri afiniteta snovi, da tekmuje z [3H]17β-estradiolom za vezavo na ER. Afiniteta je kvantificirana s koncentracijo preskusne kemikalije, ki v stacionarnem stanju zavira 50 % specifične vezave [3H]17β-estradiola (tako imenovana inhibicijska koncentracija 50 % ali IC50). To se lahko oceni tudi na podlagi relativne vezavne afinitete (RBA glede na IC50 estradiola, merjeno ločeno v isti ponovitvi). S poskusom kompetitivne vezave se meri vezava [3H]17β-estradiola pri stalni koncentraciji v prisotnosti širokega razpona (osem redov velikosti) koncentracij preskusne kemikalije. Če je mogoče, se nato podatki prilagodijo obliki Hillove enačbe (Hill, 1910), ki opisuje izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda s kompetitivno snovjo, ki se veže na eno mesto. Glede na obseg izpodrinjenja radioaktivno označenega estradiola v stacionarnem stanju se preskusna kemikalija opredeli kot snov, ki se veže, snov, ki se ne veže, ali snov, ki povzroči dvoumen odziv.

POSTOPEK

Dokazovanje sprejemljive učinkovitosti proteina hrERα

9. Pred rednim izvajanjem preskusov vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave je treba za vsako novo serijo hrERα dokazati pravilno delovanje v laboratoriju, v katerem bo uporabljena. Za dokaz učinkovitosti je treba uporabiti postopek v dveh korakih. Ta koraka sta naslednja:

— izvedite preskus vezave z nasičenjem [^{3}H]-17β-estradiola, da dokažete specifičnost in nasičenost hrERα. Analiza teh podatkov z nelinearno regresijo (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) in dobljeni Scatchardov diagram morata dokumentirati vezavno afiniteto hrERα [^{3}H]-17β-estradiola (Kd) in število receptorjev (Bmax) za vsako serijo hrERα;

— izvedite preskus kompetitivne vezave z uporabo kontrolnih snovi (referenčnega estrogena (17β-estradiola), snovi, ki se veže šibko (npr. noretinodrela ali noretindrona), in snovi, ki se ne veže (oktiltrietoksisilana, OTES). Vsak laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da dokumentira skladnost IC_{50} in drugih ustreznih vrednosti za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, med poskusi in različnimi serijami hrERα. Parametri krivulj kompetitivne vezave za kontrolne snovi morajo biti v mejah 95-odstotnega intervala zaupanja (glej preglednico 1), ki so bile določene na podlagi podatkov laboratorijev, sodelujočih v validacijski študiji za ta preskus (2).

Preglednica 1

Merila za učinkovitost, razvita za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, preskus vezave FW hrER

Snov	Parameter	Srednja vrednost [a]	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja [b]	
				Spodnja meja	Zgornja meja
17β-estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Hillov naklon	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	–8,92 ()	0,18 (67)	–8,97	–8,88

▼M8

Snov	Parameter	Srednja vrednost [a]	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja [b]	
				Spodnja meja	Zgornja meja
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov naklon	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	Log IC_{50} (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noretindron[c]	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov naklon	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	LogIC_{50} (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

([a]) Srednja vrednost (n) ± standardni odklon (SD) sta bila izračunana na podlagi ocen parametrov prileganja krivulj (4-parametrska Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v štirih laboratorijih med validacijsko študijo (glej Prilogo N k viru 2).

([b]) Pri merilih za sprejemljivost so kot vodilo navedeni 95-odstotni intervali zaupanja.

([c]) Preskušanje noretindrona za podnalogo 4 med validacijsko študijo ni bilo obvezno (glej vir 2, podnaloga 4). Tako sta bila srednja vrednost ± standardni odklon (SD) (n) izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrska Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v dveh laboratorijih.

Razpon IC_{50} je odvisen od Kd pripravka receptorja in koncentracije radioaktivno označenega liganda, uporabljenih v vsakem laboratoriju. *Dopustna je ustrezna prilagoditev razpona* IC_{50} *na podlagi pogojev, uporabljenih za izvedbo preskusa.*

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

10. Glej odstavka 17 in 18 ter preglednico 2 v oddelku „**ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER**“ te preskusne metode. Vsak preskus (vezava z nasičenjem in kompetitivna vezava) morajo sestavljati tri neodvisne ponovitve (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagentov) na različne dneve, vsaka ponovitev pa mora vsebovati tri ponovljene vzorce.

Določitev koncentracije receptorja (hrERα)

11. Koncentracija aktivnega receptorja se nekoliko razlikuje glede na serijo in pogoje shranjevanja. Iz tega razloga je treba določiti koncentracijo aktivnega receptorja, kot se prejme od dobavitelja. Tako se dobi ustrezna koncentracija aktivnega receptorja ob ponovitvi.

12. V pogojih, ki ustrezajo kompetitivni vezavi (tj. 1 nM [^{3}H]-estradiola), je treba nominalne koncentracije 0,25, 0,5, 0,75 in 1 nM receptorja inkubirati v odsotnosti (celotna vezava) in prisotnosti (nespecifična vezava) 1 μM neoznačenega estradiola. Specifična vezava, izračunana kot razlika med skupno in nespecifično vezavo, se grafično prikaže v odvisnosti od nominalne koncentracije receptorja. Koncentracija receptorja, pri kateri vrednosti specifične vezave ustrezajo 20 % dodanega izotopskega označevalca, se poveže z ustrezno nominalno koncentracijo receptorja, in to koncentracijo receptorja je treba uporabiti za poskuse vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave. Pogosto temu pogoju ustreza končna koncentracija hrER 0,5 nM.

▼M8

13. Če merila 20 % večkrat ni mogoče izpolniti, je treba preveriti morebitne napake v zasnovi poskusa. Neizpolnjevanje merila 20 % lahko nakazuje, da je v rekombinantni seriji zelo malo aktivnega receptorja, zato je treba razmisliti o uporabi druge serije receptorja.

Preskus z nasičenjem

14. Osem naraščajočih koncentracij [^{3}H]17β-estradiola je treba oceniti v treh ponovitvah v naslednjih treh pogojih (glej preglednico 2):

— v odsotnosti neoznačenega 17β-estradiola in prisotnosti ER. To je določitev celotne vezave z merjenjem radioaktivnosti v jamicah, v katerih je samo [3H]17β-estradiol;

— v prisotnosti 1 000-kratne presežne koncentracije neoznačenega 17β-estradiola v primerjavi z označenim 17β-estradiolom in prisotnosti ER. Namen tega pogoja je nasičiti aktivna vezavna mesta z neoznačenim 17β-estradiolom in z merjenjem radioaktivnosti v jamicah določiti nespecifično vezavo. Za ves preostali vroči estradiol, ki se lahko veže na receptor, se šteje, da se veže na nespecifično mesto, saj mora biti koncentracija hladnega estradiola tako visoka, da je vezan na vsa razpoložljiva specifična mesta na receptorju;

— v odsotnosti neoznačenega 17β-estradiola in odsotnosti ER (določitev skupne radioaktivnosti).

Priprava raztopin [^{3}H]-17β-estradiola in neoznačenega 17β-estradiola

15. Razredčine [^{3}H]-17β-estradiola je treba pripraviti z dodajanjem analiznega pufra v osnovne raztopine [^{3}H]-17β-estradiola s koncentracijo 12 nM, da se dobijo koncentracije, ki sprva segajo od 0,12 nM do 12 nM. Z dodajanjem 40 µl teh raztopin v ustrezne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (v končno količino 160 µl) se dobijo končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,03 do 3,0 nM. Priprava analiznega pufra, osnovne raztopine in razredčin [^{3}H]-17β-estradiola ter določitev koncentracij sta podrobno opisani v protokolu FW (2).

16. Razredčine etanolnih raztopin 17β-estradiola je treba pripraviti z dodajanjem analiznega pufra, da se dobi osem naraščajočih koncentracij, ki prvotno segajo od 0,06 µM do 6 µM. Z dodajanjem 80 µl teh raztopin v ustrezne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (v končno količino 160 µl) se dobijo končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,03 µM do 3,0 µM. Končna koncentracija neoznačenega 17β-estradiola v posameznih preskusnih jamicah za nespecifično vezavo mora biti 1 000-kratnik koncentracije označenega [^{3}H]-17β-estradiola. Priprava razredčin neoznačenega 17β-estradiola je podrobno opisana v protokolu FW (2).

17. Uporabiti je treba nominalno koncentracijo receptorja, ki daje 20 ± 5 % specifične vezave (glej odstavka 12 in 13). Raztopino hrERα je treba pripraviti neposredno pred uporabo.

18. 96-jamične mikrotitrske plošče se pripravijo, kot je prikazano v preglednici 2, s tremi ponovljenimi vzorci na koncentracijo. Primer razvrstitve [^{3}H]-17β-estradiola, neoznačenega 17β-estradiola, pufra in receptorja glede na koncentracijo in količino je naveden v Dodatku 2.2.

▼M8

Preglednica 2

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Celotna vezava (topilo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			$^{0,10\ nM\ [3H]}$ E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespecifična vezava
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			$_{1,0\ nM\ [}{}^{3}{}_{H]}$ E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [3H]-17β-estradiol.
ER: estrogenski receptor.
E2: neoznačen 17β-estradiol.

19. Preskusne mikrotitrske plošče je treba 16–20 ur inkubirati pri 2–8 °C in jih med inkubacijo namestiti na rotator.

Meritev [3H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol, vezan na hrERα, je treba ločiti od prostega [^{3}H]-17β-estradiola z dodajanjem 80 μl hladne raztopine DCC v vsako jamico, 10-minutnim stresanjem mikrotitrskih plošč in 10-minutnim centrifugiranjem pri približno 2 500 vrt./min. Da se med tem postopkom čim bolj zmanjša disociacija vezanega [^{3}H]-17β-estradiola od hrERα, je izjemno pomembno, da se pufri in preskusne jamice vzdržujejo pri 2–8 °C in da se vsaka faza izvede hitro. Za učinkovito in hitro obdelavo plošč je potreben stresalnik mikrotitrskih plošč.

21. S 50 μl supernatanta, ki vsebuje na hrERα vezan [^{3}H]-17β-estradiol, je treba ravnati nadvse previdno, da se prepreči kontaminacija jamic z dotikanjem DCC, in ga je treba namestiti na drugo mikrotitrsko ploščo.

22. V vsako jamico je nato treba dodati 200 μl scintilacijske tekočine, ki je sposobna kinetično energijo nuklearnih emisij pretvoriti v svetlobno energijo (A1–B12 in od D1 do E12). Jamice G1–H12 (opredeljene kot skupno število razgradenj na minuto) predstavljajo zaporedne razredčine [^{3}H]-17β-estradiola (40 μl), ki jih je treba dodati neposredno v scintilacijsko tekočino v jamicah merilne plošče, kot je navedeno v preglednici 3, tako da te jamice vsebujejo samo 200 μl scintilacijske tekočine in ustrezno razredčino [3H]-17β-estradiola. Te meritve pokažejo, koliko [^{3}H]-17β-estradiola v razgradnjah na minuto je bilo dodanega vsakemu nizu jamic za celotno vezavo in nespecifično vezavo.

▼M8

Preglednica 3

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem, merjenje radioaktivnosti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Celotna vezava (topilo)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespecifična vezava
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2 (skupno število razgradenj na minuto)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Skupno število razgradenj na minuto (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[3H] E2: [3H]-17β-estradiol.
ER: estrogenski receptor.
E2: neoznačen 17β-estradiol.
dpms: razgradnje na minuto
(*) Vroče serijske razredčine [^{3}H]-označenega estradiola je treba v tem primeru neposredno dodati v 200 μl scintilacijske tekočine v jamicah G1–H12.

23. Meritev se mora začeti z najmanj dvournim zamikom, čas štetja pa mora biti 40 minut na jamico. Za določitev razgradnje na minuto/jamico s korekcijo pojenjanja je treba uporabiti scintilacijski števec za mikrotitrsko ploščo. Če ni na voljo, se lahko vzorci izmerijo v običajnem števcu. V teh pogojih se lahko razmisli o skrajšanju časa štetja.

Preskus kompetitivne vezave

24. S preskusom kompetitivne vezave se meri vezava ene same koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Za vsako koncentracijo je treba pri eni ponovitvi uporabiti tri sočasne ponovljene vzorce. Poleg tega je treba za vsako kemikalijo, ki se preskuša, izvesti tri nesočasne ponovitve. Preskus je treba zasnovati na eni ali več 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah.

Kontrole

25. Pri izvajanju preskusa je treba v vsak poskus sočasno vključiti topilo in kontrole (tj. referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati (i) visoko (največje izpodrinjenje) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v vsaj treh ponovitvah. Postopki za pripravo analiznega pufra, kontrol, [^{3}H]-17β-estradiola, hrERα in raztopin preskusne kemikalije so opisani v sklicu 2 (Priloga K, glej protokol preskusa FW).

▼**M8**

Kontrola s topilom:

26. Kontrola s topilom pokaže, da topilo ne reagira s preskusnim sistemom, in poleg tega meri celotno vezavo (TB). Priporočeno topilo je etanol. Če pa najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v etanolu, se lahko uporabi DMSO. Koncentracija etanola ali DMSO, če se uporabi, v končnih preskusnih jamicah je 1,5-odstotna in ne sme presegati 2 %.

Kontrola s pufrom:

27. Kontrola s pufrom (BC) ne sme vsebovati niti topila niti preskusne kemikalije, pač pa mora vsebovati vse druge elemente preskusa. Rezultati kontrole s pufrom se primerjajo s kontrolo s topilom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem.

Snov, ki se veže močno (referenčni estrogen)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogeni ligand in se z visoko afiniteto veže na ER, podtip alfa. Za vsak preskus kompetitivne vezave na hrERα je treba z uporabo neoznačenega 17β-estradiola pripraviti standardno krivuljo, da se omogoči ocena variabilnosti, ko se preskus v daljšem časovnem obdobju izvaja v istem laboratoriju. Osem raztopin neoznačenega 17β-estradiola je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 100 nM do 10 pM (od –7[logM] do –11[logM]), razporejene pa so tako: (–7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9.5[logM], –10[logM], –11[logM]). Najvišja koncentracija neoznačenega 17β-estradiola (1 μM) se uporabi tudi kot indikator nespecifične vezave. Ta koncentracija je v preglednici 4 označena kot „NSB“, čeprav je tudi del standardne krivulje.

Snov, ki se veže šibko

29. Vključiti je treba snov, ki se veže šibko (noretinodrel (CAS68-23-5) ali noretindron (CAS 68-22-4)), da se dokaže občutljivost vsakega poskusa in omogoči ocena variabilnosti pri izvajanju preskusa v daljšem časovnem obdobju. Osem raztopin snovi, ki se veže šibko, je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 3 nM do 30 μM (od –8,5[logM] do –4,5[logM]), razporejene pa so tako: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM], –8,5[logM].

Snov, ki se ne veže

30. Kot negativno kontrolo (snov, ki se ne veže) je treba uporabiti oktiltrietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ta zagotavlja, da se s preskusom, kot je izveden, zazna, kdaj se preskusne kemikalije ne vežejo na hrERα. Osem raztopin snovi, ki se ne veže, je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 0,1 nM do 1 000 μM (od –10[logM] do –3[logM]), tako da logaritemsko naraščajo. Kot nadomestna kontrolna snov, ki se ne veže, se lahko uporabi di-*n*-butil ftalat (DBP). Njegova največja topnost dokazano znaša –4[logM].

Koncentracija hrERα

31. Uporabiti je treba količino receptorja, ki daje 20 ± 5 % specifične vezave 1 nM radioaktivno označenega liganda (glej odstavka 12 in 13 Dodatka 2). Raztopino hrERα je treba pripraviti neposredno pred uporabo.

[3H]-17β-estradiol

32. Koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola v preskusnih jamicah mora znašati 1,0 nM.

▼M8

Preskusne kemikalije

33. Najprej je treba izvesti preskus topnosti, da se določi meja topnosti za vsako preskusno kemikalijo in opredeli ustrezno območje koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusnega protokola. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje z določanjem območja sestavljajo kontrola s topilom in osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine (glej tudi odstavek 35). Preskusno kemikalijo je treba preskusiti z uporabo osmih logaritemskih krivulj, ki se med seboj razlikujejo glede na koncentracijo, kot je opredeljeno s predhodnim preskusom za določanje območja. Koncentracije pri drugem in tretjem poskusu je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo.

34. Razredčine preskusne kemikalije je treba pripraviti v ustreznem topilu (glej odstavek 26 Dodatka 2). Če najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna niti v etanolu niti v DMSO, z dodajanjem več topila pa bi koncentracija topila v končni epruveti presegala dopustno mejo, se lahko najvišja koncentracija zniža na naslednjo nižjo koncentracijo. V tem primeru se lahko dodatna koncentracija doda na spodnjem koncu niza koncentracij. Preostale koncentracije v nizu morajo ostati nespremenjene.

35. Raztopine preskusne kemikalije je treba ob dodajanju v preskusno jamico pazljivo spremljati, saj lahko preskusna kemikalija ob dodajanju v preskusno jamico obori. Podatke za vse jamice, ki vsebujejo oborino, je treba izključiti iz prileganja krivulje in navesti razlog za izključitev.

36. Če obstajajo predhodne informacije iz drugih virov, ki zagotavljajo log(IC_{50}) preskusne kemikalije, je morda ustrezno, da se razredčine razporedijo geometrično (tj. 0,5 logaritemske enote okrog pričakovanega log(IC_{50})). V končnem rezultatu je treba upoštevati zadostno razpršenost koncentracij na obe strani log(IC_{50}), vključno z zgornjo in spodnjo stranjo, tako da je mogoče krivuljo vezave ustrezno opredeliti.

Razporeditev na preskusni plošči

37. Pripraviti je treba označene mikrotitrske plošče, pri tem pa upoštevati šestkratne inkubacije z oznakami za kontrolo s topilom, najvišjo koncentracijo referenčnega estrogena, ki se uporablja tudi kot indikator nespecifične vezave (NSB), in kontrolo s pufrom, tako da se upoštevajo trikratne inkubacije z oznakami za vsako od osmih koncentracij kontrole s snovjo, ki se ne veže (oktiltrietoksisilan), sedem nižjih koncentracij referenčnega estrogena, osem koncentracij velikosti odmerka snovi, ki se veže šibko, in osem koncentracij vsake preskusne kemikalije (TC). Primer razporeditve diagrama plošče za celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole je naveden v preglednici 4 v nadaljevanju. Za preskusne kemikalije se uporabijo dodatne mikrotitrske plošče, ki morajo vključevati kontrole plošč, tj. 1) visoko (največje izpodrinjenje) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; 2) kontrolo s

▼M8

topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah (preglednica 5). Primer delovnega lista z razporeditvijo na mikrotitrski plošči za kompetitivni preskus z uporabo treh neznanih preskusnih kemikalij je naveden v Dodatku 2.3. Koncentracije, navedene v preglednicah 4 in 5, so končne koncentracije preskusa. Največja koncentracija za E2 mora biti 1×10^{-7} M, za snov, ki se veže šibko, pa je treba uporabiti najvišjo koncentracijo, uporabljeno za snov, ki se veže šibko, na plošči 1. Koncentracijo IC_{50} mora določiti laboratorij na podlagi svoje zbirke podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov. Pričakuje se, da bo ta vrednost podobna vrednosti iz validacijskih študij (glej preglednico 1).

Preglednica 4

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (plošča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo topilo)			TB (samo topilo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepi vzorec (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slepi vzorec (za vroče) (**)			Slepi vzorec (za vroče) (**)			Kontrola s pufrom			Kontrola s pufrom		

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE)
(*) dejanski slepi vzorec, jamica se ne uporablja;
(**)slepi vzorec se ne uporablja med inkubacijo, temveč se uporabi za potrditev skupne dodane radioaktivnosti.

Preglednica 5

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, celotne krivulje koncentracije za preskusne kemikalije in kontrole plošč

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo topilo)			TB (samo topilo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1 × 10-3)			TC3 (1 × 10-4)			TC3 (1 × 10-5)			TC3 (1 × 10-6)		
G	TC3 (1 × 10-7)			TC3 (1 × 10-8)			TC3 (1 × 10-9)			TC3 (1 × 10-10)		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

▼M8

Dokončanje preskusa kompetitivne vezave

38. Kot je prikazano v preglednici 6, je treba v jamice dodati 80 µl kontrole s topilom, kontrole s pufrom, referenčnega estrogena, snovi, ki se veže šibko, snovi, ki se ne veže, in preskusnih kemikalij, pripravljenih v analiznem pufru. Nato je treba v vsako jamico dodati 40 µl raztopine [3H]-17β-estradiola s koncentracijo 4 nM. Po 10–15-minutnem rahlem vrtenju pri 2–8 °C je treba dodati 40 µl raztopine hrERα. Preskusne mikrotitrske plošče je treba 16–20 ur inkubirati pri 2–8 °C in med inkubacijo namestiti na rotator.

Preglednica 6

Količina preskusnih elementov za preskus kompetitivne vezave hrER, mikrotitrske plošče

Količina (µl)	Sestavina
80	neoznačen 17β-estradiol, noretinodrel, OTES, preskusne kemikalije, topilo ali pufer
40	raztopina [^{3}H]-17β-estradiola s koncentracijo 4 nM
40	raztopina hrERα, koncentracija, kot je določena
160	***Skupna količina v vsaki preskusni jamici***

39. Nato je treba izvesti kvantifikacijo [^{3}H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, po ločitvi [^{3}H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, od prostega [^{3}H]-17β-estradiola, tako da se v vsako jamico doda 80 µl hladne raztopine DCC, kot je v odstavkih 20–23 opisano za preskus vezave z nasičenjem.

40. Jamice H1–6 (v preglednici 4 opredeljene kot slepi vzorec (za vroče)) predstavljajo razgradnje na minuto [^{3}H]-označenega-estradiola v 40 µl. 40 µl alikvota je treba dodati neposredno scintilacijski tekočini v jamicah H1–H6.

Merila za sprejemljivost

Preskus vezave z nasičenjem

41. Krivulja specifične vezave mora doseči stacionarno stanje, ko se uporabijo naraščajoče koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola, kar kaže na nasičenje hrERα z ligandom.

42. Specifična vezava pri [3H]-17β-estradiolu s koncentracijo 1 nM mora biti znotraj sprejemljivega razpona 15–25 % povprečne izmerjene skupne radioaktivnosti, dodane med ponovitvami. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi in preskus z nasičenjem ponoviti.

43. Podatki morajo dati linearen Scatchardov diagram.

44. Nespecifična vezava ne sme biti prevelika. Vrednost za nespecifično vezavo mora običajno znašati < 35 % celotne vezave. Če se meri zelo nizka razgradnja na minuto za najnižjo koncentracijo radioaktivno označenega preskušenega 17β-estradiola, pa lahko količnik to mejno vrednost občasno preseže.

▼M8

Preskus kompetitivne vezave

45. Naraščajoče koncentracije neoznačenega 17β-estradiola morajo izpodriniti [^{3}H]-17β-estradiol z receptorja na način, ki je skladen s kompetitivno vezavo na eno mesto.

46. Vrednost IC_{50} za referenčni estrogen (tj. 17β-estradiol) mora biti približno enaka molski koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola in Kd, določenemu na podlagi preskusa vezave z nasičenjem.

47. Celotna specifična vezava mora biti dosledno znotraj sprejemljivega razpona 20 ± 5 %, če je povprečna izmerjena koncentracija skupne radioaktivnosti, dodane vsaki jamici, v različnih ponovitvah znašala 1 nM. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi.

48. Topilo ne sme spremeniti občutljivosti ali obnovljivosti preskusa. Rezultati kontrole s topilom (jamice TB) se primerjajo s kontrolo s pufrom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem. Če ni učinkov topila na preskus, morajo biti rezultati TB in kontrole s pufrom primerljivi.

49. Snov, ki se ne veže, ne sme izpodriniti več kot 25 % [^{3}H]-17β-estradiola s hrERα, ko se preskusi do 10^{-3} M (OTES) ali 10^{-4} M (DBP).

50. Merila za učinkovitost so bila razvita za referenčni estrogen in dve snovi, ki se vežeta šibko (npr. noretinodrel, noretindron), pri čemer so bili uporabljeni podatki iz validacijske študije preskusa vezave hrER FW (Priloga N k viru 2). za vse kontrolne ponovitve v laboratorijih, ki sodelujejo v validacijski študiji, so za srednjo vrednost (n) +/- standardni odklon določeni 95-odstotni intervali zaupanja. 95-odstotni intervali zaupanja so bili izračunani za parametre prileganja krivulje (tj. vrh, dno, Hillov naklon, logIC_{50}) za referenčni estrogen in snovi, ki se vežejo šibko, ter za $\log_{10}$RBA snovi, ki se vežejo šibko, glede na referenčni estrogen, določeni pa so kot merila za učinkovitost za pozitivne kontrole. V preglednici 1 so določeni pričakovani razponi za parametre prileganja krivulje, ki se lahko uporabijo kot merila za učinkovitost. V praksi se lahko razpon IC_{50} nekoliko razlikuje, odvisno od Kd pripravka receptorja in koncentracije liganda.

51. Zaradi najrazličnejših obstoječih potencialnih preskusnih kemikalij ter razlik v potencialnih afinitetah in rezultatih (npr. celotna krivulja, delna krivulja, brez prileganja krivulje) pa niso bila razvita merila za učinkovitost za parametre prileganja krivulje za preskusne kemikalije. Vendar je treba pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo uporabiti strokovno presojo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh (npr. 90–100 % vezave) kompetitivne krivulje. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi nesočasnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Kontrole iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo se morajo približati meritvam učinkovitosti, sporočenim za ta preskus FW, in se ujemati s podatki zadevnega laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov.

▼M8

ANALIZA PODATKOV

Preskus vezave z nasičenjem

52. Izmerita se celotna vezava in nespecifična vezava. Iz teh vrednosti se izračuna specifična vezava naraščajočih koncentracij [^{3}H]-17β-estradiola v pogojih stacionarnega stanja, tako da se nespecifična vezava odšteje od celotne vezave. Graf specifične vezave v odvisnosti od koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola mora doseči stacionarno stanje za največjo specifično vezavo, značilno za nasičenje hrERα z [^{3}H]-17β-estradiolom. Poleg tega je treba v analizi podatkov dokumentirati vezavo [^{3}H]-17β-estradiola na eno samo vezavno mesto z visoko afiniteto. Na krivulji vezave z nasičenjem morajo biti prikazane nespecifična, skupna in specifična vezava. Pri nadaljnji analizi teh podatkov je treba uporabiti analizo nelinearne regresije (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s končnim prikazom podatkov v obliki Scatchardovega diagrama.

53. S podatkovno analizo je treba določiti Bmax in Kd zgolj na podlagi podatkov o celotni vezavi, pri čemer se domneva, da je nespecifična vezava linearna, razen če se utemelji uporaba druge metode. Poleg tega je treba pri določanju najboljšega prileganja uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Pri določanju Bmax in Kd na podlagi podatkov o vezavi z nasičenjem je treba vedno uporabiti popravek zaradi izgube liganda (npr. z uporabe metode po Swillensu, 1995).

Preskus kompetitivne vezave

54. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [^{3}H]-17β-estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log10) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki zavre 50 % največje specifične vezave [^{3}H]-17β-estradiola, je vrednost IC_{50}.

55. Ocene vrednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Vrh, dno, naklon in log(IC_{50}) je treba pri prileganju teh krivulj na splošno pustiti neomejene. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Popravek zaradi izgube liganda se ne sme uporabiti. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezno prileganje modelu. Relativno vezavno afiniteto (RBA) za snov, ki se veže šibko, je treba izračunati kot delež log (IC_{50}) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrol in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa iz odstavkov 45–50 tega dodatka 2.

56. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Priporočljivo je, da se pri vsaki ponovitvi za preskusno kemikalijo najprej izvede standardizirana podatkovna analiza, enaka tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko (glej odstavek 55 zgoraj). Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja v deležu specifično vezanega [^{3}H]-17β-estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji kemikalije in skladnost v parametrih prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno.

▼M8

Razlaga podatkov

57. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se veže na hrERα, če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov pod 50 % (slika 1).

58. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se ne veže na hrERα, če:

— je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 % ali

— krivulje vezave ni mogoče prilagoditi in je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.

59. Preskusne kemikalije se štejejo za dvoumne, če ni izpolnjen nobeden od zgoraj navedenih pogojev (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

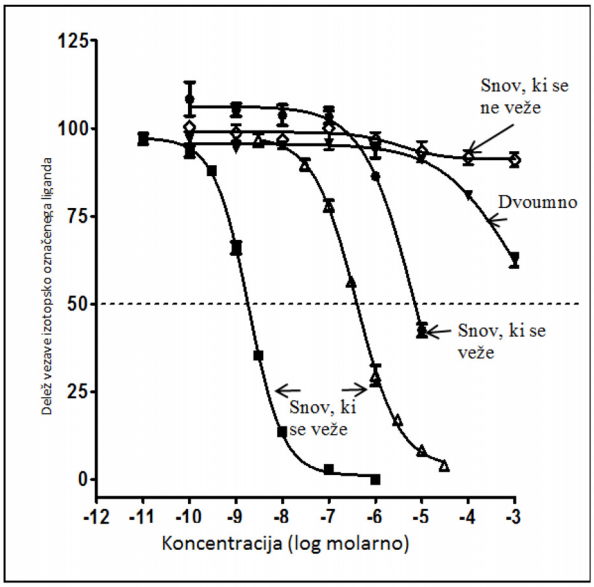
Preglednica 7

Merila za določitev razvrstitve na podlagi krivulje kompetitivne vezave za preskusno kemikalijo

Razvrstitev	Merila
Snov, ki se veže[a]	Krivuljo vezave je mogoče prilagoditi. **Najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov je pod 50 %.**
Snov, ki se ne veže[b]	Če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi, **je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 %.** Če krivulje vezave ni mogoče prilagoditi, **je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.**
Dvoumno[c]	Vsaka preskušena ponovitev, ki ni niti snov, ki se veže, niti snov, ki se ne veže (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

Slika 1:

Primeri razvrstitve preskusne kemikalije z uporabo krivulje kompetitivne vezave



▼M8

60. V laboratoriju izvedene večkratne ponovitve za preskusno kemikalijo se združijo, tako da se vsaki ponovitvi dodelijo številčne vrednosti in se izračuna povprečje med ponovitvami, kot je prikazano v preglednici 8. Rezultati za združene ponovitve v posameznem laboratoriju se primerjajo s pričakovano razvrstitvijo za vsako preskusno kemikalijo.

Preglednica 8

Metoda za razvrstitev preskusne kemikalije z uporabo večkratnih ponovitev v laboratoriju

Za dodelitev vrednosti vsaki ponovitvi:	
Razvrstitev	**Številčna vrednost**
Snov, ki se veže	2
Dvoumno	1
Snov, ki se ne veže	0
Za razvrstitev povprečja številčne vrednosti med ponovitvami:	
Razvrstitev	**Številčna vrednost**
Snov, ki se veže	povprečje $\geq$ 1,5
Dvoumno	0,5 $\leq$ povprečje $<$ 1,5
Snov, ki se ne veže	povprečje $<$ 0,5

POROČILO O PRESKUSU

61. Glej odstavek 24 v oddelku „**ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER**“ te preskusne metode.

▼**M8**

Dodatek 2.1

SEZNAM IZRAZOV

[^{3}H]E2 17β-estradiol, radioaktivno označen s tritijem

DCC oglje, prevlečeno z dekstranom

E_2 neoznačen 17β-estradiol (inertni)

Analizni pufer 10 mM Trisa, 10 mg govejega serumskega albumina/ml, 2 mM DTT, 10-odstotni glicerol, 0,2 mM leupeptina, pH 7,5

hrERα človeški rekombinantni estrogenski receptor alfa.

Ponovljeni vzorec ena od več jamic, ki imajo enako vsebino pri enakih koncentracijah in se preskusijo sočasno v eni sami ponovitvi. V tem protokolu se vsaka koncentracija preskusne kemikalije preskusi v treh ponovitvah; to pomeni, da se pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije sočasno preskusijo trije ponovljeni vzorci.

Ponovitev celoten nabor jamic pri sočasno izvedenem preskusu z mikrotitrsko ploščo, ki zagotavlja vse potrebne informacije za opredelitev vezave preskusne kemikalije na hrERα (tj. skupni [^{3}H]-17β-estradiol, dodan v preskusno jamico, največja vezava [^{3}H]-17β-estradiola na hrERα, nespecifična vezava in celotna vezavaa pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije). Ponovitev bi lahko sestavljala tudi ena sama preskusna jamica (tj. ponovljeni vzorec) na koncentracijo, ker pa ta protokol zahteva preskušanje v treh ponovitvah, eno ponovitev sestavljajo tri preskusne jamice na koncentracijo. Poleg tega ta protokol zahteva tri neodvisne (tj. nesočasne) ponovitve na kemikalijo.

▼**M8**

Dodatek 2.2

ZNAČILNI PRESKUS NASIČENJA S [^{3}H]-17B-ESTRADIOLOM S TREMI JAMICAMI S PONOVLJENIMI VZORCI

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17β-estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (µl)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina hladnega E2 (µl)	Končna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina pufra (µl)	Količina receptorja (µl)	Skupna količina v jamicah
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼M8

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17β-estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci											
Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (µl)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina hladnega E2 (µl)	Končna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina pufra (µl)	Količina receptorja (µl)	Skupna količina v jamicah
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17β-estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (µl)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina hladnega E2 (µl)	Končna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina pufra (µl)	Količina receptorja (µl)	Skupna količina v jamicah
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17β-estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (µl)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina hladnega E2 (µl)	Končna koncentracija hladnega E2 (µM)	Količina pufra (µl)	Količina receptorja (µl)	Skupna količina v jamicah
H1	1	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Opozoriti je treba, da so ‚vroče‘ jamice med inkubacijo prazne. 40 µl se doda samo za scintilacijsko štetje.

▼**M8**

Dodatek 2.3

RAZPOREDITEV JAMIC ZA PRESKUS KOMPETITIVNE VEZAVE

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	A1	1	celotna vezava	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
trdno	A2	2	celotna vezava	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
trdno	A3	3	celotna vezava	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
trdno	A4	1	celotna vezava	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
trdno	A5	2	celotna vezava	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
trdno	A6	3	celotna vezava	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
trdno	A7	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	A8	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	A9	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	A10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	A11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	A12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	B1	1	hladen E2	trdno	S1	$2{,}00E^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
trdno	B2	2	hladen E2	trdno	S1	$2{,}00E^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
trdno	B3	3	hladen E2	trdno	S1	$2{,}00E^{-7}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
trdno	B4	1	hladen E2	trdno	S2	$2{,}00E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	B5	2	hladen E2	trdno	S2	$2{,}00E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
trdno	B6	3	hladen E2	trdno	S2	$2{,}00E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
trdno	B7	1	hladen E2	trdno	S3	$6{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
trdno	B8	2	hladen E2	trdno	S3	$6{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
trdno	B9	3	hladen E2	trdno	S3	$6{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
trdno	B10	1	hladen E2	trdno	S4	$2{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
trdno	B11	2	hladen E2	trdno	S4	$2{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
trdno	B12	3	hladen E2	trdno	S4	$2{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
trdno	C1	1	hladen E2	trdno	S5	$6{,}00E^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-10}$
trdno	C2	2	hladen E2	trdno	S5	$6{,}00E^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-10}$
trdno	C3	3	hladen E2	trdno	S5	$6{,}00E^{-10}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-10}$
trdno	C4	1	hladen E2	trdno	S6	$2{,}00E^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
trdno	C5	2	hladen E2	trdno	S6	$2{,}00E^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
trdno	C6	3	hladen E2	trdno	S6	$2{,}00E^{-10}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
trdno	C7	1	hladen E2	trdno	S7	$2{,}00E^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-11}$
trdno	C8	2	hladen E2	trdno	S7	$2{,}00E^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-11}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	C9	3	hladen E2	trdno	S7	$2{,}00E^{-11}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-11}$
trdno	C10	1	slepi vzorec	slepi vzorec	B1	—	—	160	—	—	160	—
trdno	C11	2	slepi vzorec	slepi vzorec	B2	—	—	160	—	—	160	—
trdno	C12	3	slepi vzorec	slepi vzorec	B3	—	—	160	—	—	160	—
trdno	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	$6{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
trdno	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	$6{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
trdno	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	$6{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
trdno	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	$2{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
trdno	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	$2{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
trdno	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	$2{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
trdno	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	$6{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-6}$
trdno	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	$6{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-6}$
trdno	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	$6{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-6}$
trdno	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
trdno	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
trdno	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
trdno	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
trdno	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
trdno	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
trdno	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-8}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-8}$
trdno	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-8}$
trdno	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
trdno	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
trdno	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-9}$
trdno	F1	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
trdno	F2	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
trdno	F3	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-3}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
trdno	F4	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
trdno	F5	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
trdno	F6	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-4}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
trdno	F7	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
trdno	F8	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
trdno	F9	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-5}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-5}$
trdno	F10	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	F11	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	F12	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
trdno	G1	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
trdno	G2	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
trdno	G3	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-7}$	40	—	40	80	160	$3{,}0E^{-7}$
trdno	G4	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
trdno	G5	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	G6	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-8}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
trdno	G7	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
trdno	G8	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
trdno	G9	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-9}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
trdno	G10	1	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0E^{-10}$
trdno	G11	2	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0E^{-10}$
trdno	G12	3	OTES	NE	OTES	$2{,}00E^{-10}$	40	—	40	—	160	$1{,}0E^{-10}$
trdno	H1	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H2	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H3	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H4	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H5	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H6	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H7	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H8	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H9	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H10	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H11	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H12	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Opozoriti je treba, da so ‚vroče' jamice med inkubacijo prazne. 40 µl se doda samo za scintilacijsko štetje.

▼M8

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina na plošči z razredčinami (µl)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	A1	1	celotna vezava	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	celotna vezava	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	celotna vezava	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	celotna vezava	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	celotna vezava	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	celotna vezava	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A8	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A9	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	A12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	$2{,}00E^{-6}$	40	—	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	B1	1	preskusna kemikalija 1	TC1	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	B2	2	preskusna kemikalija 1	TC1	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	B3	3	preskusna kemikalija 1	TC1	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	B4	1	preskusna kemikalija 1	TC1	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	B5	2	preskusna kemikalija 1	TC1	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	B6	3	preskusna kemikalija 1	TC1	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	B7	1	preskusna kemikalija 1	TC1	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	B8	2	preskusna kemikalija 1	TC1	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	B9	3	preskusna kemikalija 1	TC1	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	B10	1	preskusna kemikalija 1	TC1	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	B11	2	preskusna kemikalija 1	TC1	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	B12	3	preskusna kemikalija 1	TC1	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$

▼M8

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina na plošči z razredčinami (µl)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	C1	1	preskusna kemikalija 1	TC1	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	C2	2	preskusna kemikalija 1	TC1	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	C3	3	preskusna kemikalija 1	TC1	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	C4	1	preskusna kemikalija 1	TC1	6	$2{,}00E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	C5	2	preskusna kemikalija 1	TC1	6	$2{,}00E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	C6	3	preskusna kemikalija 1	TC1	6	$2{,}00E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	C7	1	preskusna kemikalija 1	TC1	7	$2{,}00E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	C8	2	preskusna kemikalija 1	TC1	7	$2{,}00E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	C9	3	preskusna kemikalija 1	TC1	7	$2{,}00E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	C10	1	preskusna kemikalija 1	TC1	8	$2{,}00E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	C11	2	preskusna kemikalija 1	TC1	8	$2{,}00E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	C12	3	preskusna kemikalija 1	TC1	8	$2{,}00E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	D1	1	preskusna kemikalija 2	TC2	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	D2	2	preskusna kemikalija 2	TC2	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	D3	3	preskusna kemikalija 2	TC2	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	D4	1	preskusna kemikalija 2	TC2	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	D5	2	preskusna kemikalija 2	TC2	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	D6	3	preskusna kemikalija 2	TC2	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	D7	1	preskusna kemikalija 2	TC2	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	D8	2	preskusna kemikalija 2	TC2	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	D9	3	preskusna kemikalija 2	TC2	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	D10	1	preskusna kemikalija 2	TC2	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	D11	2	preskusna kemikalija 2	TC2	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	D12	3	preskusna kemikalija 2	TC2	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$

▼M8

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina na plošči z razredčinami (µl)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	E1	1	preskusna kemikalija 2	TC2	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	E2	2	preskusna kemikalija 2	TC2	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	E3	3	preskusna kemikalija 2	TC2	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	E4	1	preskusna kemikalija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	E5	2	preskusna kemikalija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	E6	3	preskusna kemikalija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	E7	1	preskusna kemikalija 2	TC2	7	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	E8	2	preskusna kemikalija 2	TC2	7	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	E9	3	preskusna kemikalija 2	TC2	7	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	E10	1	preskusna kemikalija 2	TC2	8	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	E11	2	preskusna kemikalija 2	TC2	8	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	E12	3	preskusna kemikalija 2	TC2	8	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	F1	1	preskusna kemikalija 3	TC3	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	F2	2	preskusna kemikalija 3	TC3	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	F3	3	preskusna kemikalija 3	TC3	1	$2{,}00E^{-3}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-3}$
P1	F4	1	preskusna kemikalija 3	TC3	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	F5	2	preskusna kemikalija 3	TC3	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	F6	3	preskusna kemikalija 3	TC3	2	$2{,}00E^{-4}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-4}$
P1	F7	1	preskusna kemikalija 3	TC3	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	F8	2	preskusna kemikalija 3	TC3	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	F9	3	preskusna kemikalija 3	TC3	3	$2{,}00E^{-5}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-5}$
P1	F10	1	preskusna kemikalija 3	TC3	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	F11	2	preskusna kemikalija 3	TC3	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$
P1	F12	3	preskusna kemikalija 3	TC3	4	$2{,}00E^{-6}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-6}$

▼**M8**

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina na plošči z razredčinami (µl)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	G1	1	preskusna kemikalija 3	TC3	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	G2	2	preskusna kemikalija 3	TC3	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	G3	3	preskusna kemikalija 3	TC3	5	$2{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-7}$
P1	G4	1	preskusna kemikalija 3	TC3	6	$2{,}00E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	G5	2	preskusna kemikalija 3	TC3	6	$2{,}00E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	G6	3	preskusna kemikalija 3	TC3	6	$2{,}00E^{-8}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-8}$
P1	G7	1	preskusna kemikalija 3	TC3	7	$2{,}00E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	G8	2	preskusna kemikalija 3	TC3	7	$2{,}00E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	G9	3	preskusna kemikalija 3	TC3	7	$2{,}00E^{-9}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-9}$
P1	G10	1	preskusna kemikalija 3	TC3	8	$2{,}00E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	G11	2	preskusna kemikalija 3	TC3	8	$2{,}00E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	G12	3	preskusna kemikalija 3	TC3	8	$2{,}00E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0E^{-10}$
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		$1{,}00E^{-4{,}5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	hladen E2 S			$1{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	hladen E2 S			$1{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	hladen E2 S			$1{,}00E^{-7}$	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Dodatek 3

IN VITRO PRESKUS VEZAVE NA ESTROGENSKE RECEPTORJE Z UPORABO ČLOVEŠKEGA REKOMBINANTNEGA PROTEINA ERA Z DOMENO ZA VEZAVO LIGANDOV INSTITUTA CERI (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE)

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem *in vitro* preskusu vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave na estrogenske receptorje (ERα) se uporablja domena za vezavo liganda (LBD) človeškega ERα (hrERα). Ta proteinski konstrukt je proizvedel japonski inštitut Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), obstaja pa kot fuzijski protein glutation-S-transferaza (GST) in je izražen v *E. coli*. Protokol CERI je bil predmet mednarodne validacijske študije, izvedene več laboratorijih (2), ki je dokazala njegovo ustreznost in zanesljivost za predvideni namen preskusa.

2. Ta preskus je presejalni postopek za opredelitev snovi, ki se lahko vežejo na hrERα. Uporablja se za določitev zmožnosti preskusne kemikalije, da tekmuje s 17β-estradiolom za vezavo na hrERα-LBD. Rezultati kvantitativne analize lahko vključujejo IC_{50} (merilo koncentracije preskusne kemikalije, potrebne, da izpodrine polovico [^{3}H]-17β-estradiola s hrERα) in relativne vezavne afinitete preskusnih kemikalij za hrERα v primerjavi s 17β-estradiolom. Za namene presejanja kemikalij lahko sprejemljivi rezultati kvalitativne analize vključujejo razvrstitve preskusnih kemikalij kot snovi, ki se vežejo na hrERα, snovi, ki se ne vežejo, ali dvoumne snovi na podlagi meril, opisanih za krivulje vezave.

3. Pri preskusu se uporabi radioaktivno označen ligand, zaradi katerega laboratorij potrebuje dovoljenje za radioaktivne materiale. Vsi postopki z radioizotopi in nevarnimi kemikalijami morajo potekati v skladu s predpisi in postopki, kot so opisani v nacionalni zakonodaji.

4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka **„SPLOŠNI UVOD“** in **„ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER“**. Opredelitve in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 1.

NAČELA PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. S preskusom vezave na hrERα se meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([^{3}H]17β-estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja.

6. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand in nato poskusa kompetitivne vezave ER, za katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.

▼M8

7. Namen poskusa vezave z nasičenjem je opredeliti določeno serijo receptorjev za vezavno afiniteto in število vezav kot pripravo na poskus kompetitivne vezave. S poskusom vezave z nasičenjem se v pogojih stacionarnega stanja merita afiniteta stalne koncentracije estrogenskega receptorja do njegovega naravnega liganda (ki jo predstavlja disociacijska konstanta, Kd) in koncentracija aktivnih receptorskih mest (Bmax).

8. S poskusom kompetitivne vezave se meri afiniteta snovi, da tekmuje s [^{3}H]17β-estradiolom za vezavo na ER. Afiniteta je kvantificirana s koncentracijo preskusne kemikalije, ki v stacionarnem stanju zavre 50 % specifične vezave [^{3}H]17β-estradiola (tako imenovana inhibicijska koncentracija 50 % ali IC_{50}). To se lahko oceni tudi na podlagi relativne vezavne afinitete (RBA glede na IC_{50} estradiola, merjeno ločeno v isti ponovitvi). S poskusom kompetitivne vezave se meri vezava [^{3}H]17β-estradiola pri stalni koncentraciji v prisotnosti širokega razpona (osem redov velikosti) koncentracij preskusne kemikalije. Če je mogoče, se nato podatki prilagodijo obliki Hillove enačbe (Hill, 1910), ki opisuje izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda s kompetitivno snovjo, ki se veže na eno mesto. Glede na obseg izpodrinjenja radioaktivno označenega estradiola v stacionarnem stanju se preskusna kemikalija opredeli kot snov, ki se veže, snov, ki se ne veže, ali snov, ki povzroči dvoumen odziv.

POSTOPEK

Dokazovanje sprejemljive učinkovitosti proteina hrERα

9. Pred rednim izvajanjem preskusov vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave je treba za vsako novo serijo hrERα dokazati pravilno delovanje v laboratoriju, v katerem bo uporabljena. Za dokaz učinkovitosti je treba uporabiti postopek v dveh korakih. Ta koraka sta naslednja:

— izvedite preskus vezave z nasičenjem [3H]-17β-estradiola, da dokažete specifičnost in nasičenje hrERα. Analiza teh podatkov z nelinearno regresijo (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) in dobljeni Scatchardov diagram morata dokumentirati vezavno afiniteto hrERα [^{3}H]-17β-estradiola (Kd) in število receptorjev (Bmax) za določeno serijo hrERα;

— izvedite preskus kompetitivne vezave z uporabo kontrolnih snovi (referenčnega estrogena (17β-estradiola), snovi, ki se veže šibko (npr. noretinodrela ali noretindrona), in snovi, ki se ne veže (oktiltrietoksisilana, OTES). Vsak laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da dokumentira skladnost IC50 in ustreznih vrednosti za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, med poskusi in različnimi serijami hrERα. Poleg tega morajo biti parametri krivulj kompetitivne vezave za kontrolne snovi v mejah 95-odstotnega intervala zaupanja (glej preglednico 1), ki so bile določene na podlagi podatkov laboratorijev, sodelujočih v validacijski študiji za ta preskus (2).

Preglednica 1

Merila za učinkovitost, razvita za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, preskus vezave na hrER organizacije CERI

Snov	Parameter	Srednja vrednost [a]	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja [b]	
				Spodnja meja	Zgornja meja
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Snov	Parameter	Srednja vrednost [a]	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja [b]	
				Spodnja meja	Zgornja meja
	Hillov naklon	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov naklon	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindron [c]	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillov naklon	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

([a]) Srednja vrednost ± standardni odklon (SD) z velikostjo vzorca (n) sta bila izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrska Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v štirih laboratorijih med validacijsko študijo (glej Prilogo N k viru 2).

([b]) Pri merilih za sprejemljivost so kot vodilo navedeni 95-odstotni intervali zaupanja.

([c]) Preskušanje noretindrona za podnalogo 4 med validacijsko študijo ni bilo obvezno (glej vir 2, podnaloga 4). Tako sta bila srednja vrednost ± standardni odklon (SD) (n) izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrska Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v dveh laboratorijih.
Razpon IC_{50} je odvisen od Kd pripravka receptorja in koncentracije radioaktivno označenega liganda, uporabljenih v vsakem laboratoriju. Dopustna je ustrezna prilagoditev razpona IC_{50} na podlagi pogojev, uporabljenih za izvedbo preskusa.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

10. Glej odstavka 17 in 18 ter preglednico 2 v oddelku „**ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER**“ te preskusne metode. Vsak preskus (vezava z nasičenjem in kompetitivna vezava) morajo sestavljati tri neodvisne ponovitve (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagentov) na različne dneve, vsaka ponovitev pa mora vsebovati tri ponovljene vzorce.

Določitev koncentracije receptorja (hrERα)

11. Koncentracija aktivnega receptorja se nekoliko razlikuje glede na serijo in pogoje shranjevanja. Iz tega razloga je treba določiti koncentracijo aktivnega receptorja, kot se prejme od dobavitelja. Tako se dobi ustrezna koncentracija aktivnega receptorja ob ponovitvi.

12. V pogojih, ki ustrezajo kompetitivni vezavi (tj. 0,5 nM [^{3}H]-17β- estradiola), je treba nominalne koncentracije 0,1, 0,2, 0,4 in 0,6 nM receptorja inkubirati v odsotnosti (celotna vezava) in prisotnosti (nespecifična vezava) 1 μM neoznačenega estradiola. Specifična vezava, izračunana kot razlika med

▼M8

skupno in nespecifično vezavo, se grafično prikaže v odvisnosti od nominalne koncentracije receptorja. Koncentracija receptorja, pri kateri vrednosti specifične vezave ustrezajo 40 % dodanega izotopskega označevalca, se poveže z ustrezno koncentracijo receptorja, in to koncentracijo receptorja je treba uporabiti za poskuse vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave. Pogosto temu pogoju ustreza končna koncentracija hrER, ki znaša 0,2 nM.

13. Če merila 40 % večkrat ni mogoče izpolniti, je treba preveriti morebitne napake v zasnovi poskusa. Neizpolnitev merila 40 % lahko nakazuje, da je v rekombinantni seriji zelo malo aktivnega receptorja, zato je treba razmisliti o uporabi druge serije receptorja.

Preskus z nasičenjem

14. Osem naraščajočih koncentracij [^{3}H]17β-estradiola je treba oceniti v treh ponovitvah v naslednjih treh pogojih (glej preglednico 2):

a. v odsotnosti neoznačenega 17β-estradiola in prisotnosti ER. To je določitev celotne vezave z merjenjem radioaktivnosti v jamicah, v katerih je samo [^{3}H]17β-estradiol;

b. v prisotnosti 2000-kratne presežne koncentracije neoznačenega 17β-estradiola v primerjavi z označenim 17β-estradiolom in prisotnosti ER. Namen tega pogoja je nasičiti aktivna vezavna mesta z neoznačenim 17β-estradiolom in z merjenjem radioaktivnosti v jamicah določiti nespecifično vezavo. Za ves preostali vroči estradiol, ki se lahko veže na receptor, se šteje, da se veže na nespecifično mesto, saj mora biti koncentracija hladnega estradiola tako visoka, da je vezan na vsa razpoložljiva specifična mesta na receptorju;

c. v odsotnosti neoznačenega 17β-estradiola in odsotnosti ER (določitev skupne radioaktivnosti).

Priprava raztopin [^{3}H]-17β-estradiola in neoznačenega 17β-estradiola ter hrERα

15. 40 nM raztopine [^{3}H]-17β-estradiola je treba pripraviti iz 1 μM osnovne raztopine [^{3}H]-17β-estradiola v DMSO, tako da se pri sobni temperaturi dodata DMSO (za pripravo koncentracije, ki znaša 200 nM) in analizni pufer (za pripravo koncentracije, ki znaša 40 nM). Z uporabo te raztopine s koncentracijo 40 nM se pripravijo serije razredčine [^{3}H]-17β-estradiola, ki segajo od 0,313 nM do 40 nM, z analiznim pufrom pri sobni temperaturi (kot je prikazano v vrstici 12 preglednice 2). Končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,0313 do 4,0 nM, se dobijo z dodajanjem 10 μl teh raztopin v zadevne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (glej preglednici 2 in 3). Priprava analiznega pufra, izračun prvotne osnovne raztopine [^{3}H]-17β-estradiola na podlagi njegovega specifičnega delovanja, priprava razredčin in določitev koncentracij so podrobno opisani v protokolu CERI (2).

16. Razredčine raztopin neoznačenega 17β-estradiola je treba pripraviti iz 1 nM osnovne raztopine 17β-estradiola z dodajanjem analiznega pufra, da se dobi osem naraščajočih koncentracij, ki prvotno segajo od 0,625 μM do 80 μM. Končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,0625 μM do 8 μM, se dobijo z dodajanjem 10 μl teh raztopin v zadevne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči, namenjeni meritvi nespecifične vezave (glej preglednici 2 in 3). Priprava razredčin neoznačenega 17β-estradiola je podrobno opisana v protokolu CERI (2).

▼**M8**

17. Uporabiti je treba koncentracijo receptorja, ki daje 40 ± 10 % specifične vezave (glej odstavka 12 in 13). Raztopino hrERα je treba pripraviti z ledeno mrzlim analiznim pufrom neposredno pred uporabo, tj. ko so pripravljene vse jamice za celotno vezavo, nespecifično vezavo in samo vroči ligand.

18. 96-jamične mikrotitrske plošče se pripravijo, kot je prikazano v preglednici 2, s tremi ponovljenimi vzorci na koncentracijo [^{3}H]-17β-estradiola. Dodelitev količine [^{3}H]-17β-estradiola, neoznačenega 17β-estradiola, pufra in receptorja je navedena v preglednici 3.

Preglednica 2

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Za meritev TB			Za meritev NSB			Za določitev samo vročega liganda				Razredčine neoznačenega E2 za stolpec plošče 4–6	Razredčine [3H]E2 za stolpec plošče 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: celotna vezava.
NSB: nespecifična vezava.
[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-estradiol
E2: neoznačen 17β-estradiol.
(*) Navedene koncentracije so v tem primeru končne koncentracije v vsaki jamici.
(**) Razredčine neoznačenega E2 in [^{3}H]E2 se lahko pripravijo na drugi plošči.

▼M8

Preglednica 3

Količine reagenta na mikrotitrski plošči za nasičenje

Številka vrstice		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Koraki priprave		Jamice za TB			Jamice za NSB			Samo vroč ligand		
Količina elementov za zgornje reakcijske jamice in vrstni red dodajanja	Pufer	60 µl			50 µl			90 µl		
	neoznačen E2 iz vrstice 11 v preglednici 2	–			10 µl			–		
	[3H]E2 iz vrstice 12 v preglednici 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Skupna reakcijska količina		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubacija		**REAKCIJA PO 2-URNI INKUBACIJI**						Kvantifikacija radioaktivnosti takoj po pripravi. Brez inkubacije		
Tretiranje z 0,4-odstotnim DCC		da			da			**ne**		
Količina 0,4-odstotnega DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtracija		da			da			ne		
MERJENJE RAZGRADENJ NA MINUTO (DPMS)										
Količina za kvantifikacijo, dodana scintilacijski zmesi		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Če se za merjenje dpms uporablja tekočinsko scintilacijsko štetje za mikrotitrske plošče, priprava samo vročega liganda na isti preskusni plošči z jamicami s TB in NSB ni ustrezna. Samo vroči ligand je treba pripraviti na drugi plošči.

(**) Če se za ločevanje DCC uporabi centrifugiranje, je treba 50 µl supernatanta meriti s tekočinskim scintilacijskim štetjem, da se prepreči kontaminacija DCC.

19. Preskusne mikrotitrske plošče za določitev celotne vezave in nespecifične vezave je treba dve uri inkubirati pri sobni temperaturi (22–28 °C).

Meritev [^{3}H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα

20. Po dvourni inkubaciji je treba [^{3}H]-17β-estradiol, vezan na hrERα, ločiti od prostega [^{3}H]-17β-estradiola, tako da se v jamice doda 100 µl ledeno mrzle raztopine 0,4-odstotnega DCC. Plošče je treba nato za 10 minut postaviti na led, reakcijsko zmes in raztopino DCC pa filtrirati, tako da se ju prenese na filter za mikrotitrske plošče, da se odstrani DCC. Nato je treba v scintilacijsko tekočino v vialah za tekočinsko scintilacijsko štetje dodati 100 µl filtrata, da se s tekočinskim scintilacijskim štetjem določi razgradnja na minuto (dpms) na vialo.

▼M8

21. Če filter za mikrotitrsko ploščo ni na voljo, se lahko DCC odstrani tudi s centrifugiranjem. S 50 µl supernatanta, ki vsebuje na hrERα vezan [^{3}H]-17β-estradiol, je treba ravnati nadvse previdno, da se prepreči kontaminacija jamic z dotikanjem DCC, in ga je treba uporabiti za scintilacijsko štetje.

22. Pogoji s samo vročim ligandom se uporabijo za določitev razgradnje na minuto (dpm) za [^{3}H]-17β-estradiol, dodan v preskusne jamice. Radioaktivnost je treba kvantitativno določiti takoj po pripravi. Jamice se ne smejo inkubirati in ne smejo biti tretirane z raztopino DCC, temveč je treba njihovo vsebino dodatni neposredno scintilacijski tekočini. Te meritve pokažejo, koliko [^{3}H]-17β-estradiola v razgradnjah na minuto je bilo dodanega vsakemu nizu jamic za celotno vezavo in nespecifično vezavo.

Preskus kompetitivne vezave

23. S preskusom kompetitivne vezave se meri vezava ene same koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Za vsako koncentracijo je treba pri eni ponovitvi uporabiti tri sočasne ponovljene vzorce. Poleg tega je treba za vsako kemikalijo, ki se preskuša, izvesti tri nesočasne ponovitve. Preskus je treba zasnovati na eni ali več 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah.

Kontrole

24. Pri izvajanju preskusa je treba v vsak poskus sočasno vključiti topilo in kontrole (tj. referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati (i) visoko (največje izpodrinjenje, tj. približno popolno izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah. Postopki za pripravo analiznega pufra, kontrol, [^{3}H]-17β-estradiola, hrERα in raztopin preskusne kemikalije so podrobno opisani v protokolu CERI (2).

Kontrola s topilom

25. Kontrola s topilom pokaže, da topilo ne reagira s preskusnim sistemom, in poleg tega meri celotno vezavo (TB). Priporočeno topilo je DMSO. Če pa najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v DMSO, se lahko uporabi etanol. Koncentracija DMSO v končnih preskusnih jamicah mora biti 2,05 % in se lahko v primeru premajhne topnosti preskusne kemikalije poviša 2,5 %. Koncentracije DMSO nad 2,5 % se ne smejo uporabiti zaradi interference višjih koncentracij topila s preskusom. Za preskusne kemikalije, ki niso topne v DMSO, topne pa so v etanolu, se lahko brez interference v preskusu uporabi največ 2-odstotni etanol.

Kontrola s pufrom

26. Kontrola s pufrom (BC) ne sme vsebovati niti topila niti preskusne kemikalije, pač pa mora vsebovati vse druge elemente preskusa. Rezultati kontrole s pufrom se primerjajo s kontrolo s topilom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem.

▼**M8**

Snov, ki se veže močno (referenčni estrogen)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) je endogeni ligand in se z visoko afiniteto veže na ER, podtip alfa. Za vsak preskus kompetitivne vezave na hrERα je treba z uporabo neoznačenega 17β-estradiola pripraviti standardno krivuljo, da se omogoči ocena variabilnosti, ko se preskus v daljšem časovnem obdobju izvaja v istem laboratoriju. Osem raztopin neoznačenega 17β-estradiola je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufru, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah, ki jih je treba uporabiti, segajo od 100 nM do 10 pM (od –7\[logM] do –11\[logM]), razporejene pa so tako: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Najvišja koncentracija neoznačenega 17β-estradiola (1 μM) se mora uporabiti kot indikator nespecifične vezave. Ta koncentracija je v preglednici 4 označena kot „NSB“, čeprav je tudi del standardne krivulje.

Snov, ki se veže šibko

28. Vključiti je treba snov, ki se veže šibko (noretinodrel (CAS68-23-5) ali namesto njega noretindron (CAS 68-22-4)), da se dokaže občutljivost vsakega poskusa in omogoči ocena variabilnosti pri izvajanju preskusa v daljšem časovnem obdobju. Osem raztopin snovi, ki se veže šibko, je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufru, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah znašajo: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} in 10^{-9} M.

Snov, ki se ne veže

29. Kot negativno kontrolo (snov, ki se ne veže) je treba uporabiti oktiltrietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ta zagotavlja, da se s preskusom, kot je izveden, zaznajo preskusne kemikalije, ki se ne vežejo na hrERα. Osem raztopin snovi, ki se ne veže, je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufru, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah znašajo: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Kot nadomestna snov, ki se ne veže, se lahko uporabi di–n-butil ftalat (DBP, CAS 84-72-2), vendar se lahko preskusi samo do koncentracije 10^{-4} M. Dokazano je bilo, da največja topnost DBP v preskusu znaša 10^{-4} M.

Koncentracija hrERα

30. Uporabiti je treba količino receptorja, ki daje 40 ± 10 % specifične vezave (glej odstavka 12 in 13 Dodatka 3). Raztopino hrERα je treba pripraviti z redčenjem funkcionalne hrERα v ledeno mrzlem analiznem pufru neposredno pred uporabo.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Končna koncentracija [^{3}H]-17β-estradiola v preskusnih jamicah mora znašati 0,5 nM.

Preskusne kemikalije

32. Najprej je treba izvesti preskus topnosti, da se določi meja topnosti za vsako preskusno kemikalijo in opredeli ustrezno območje koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusnega protokola. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje z določanjem območja vključuje kontrolo s topilom in vsaj osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni

▼M8

koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine (glej tudi odstavek 35 Dodatka 3). Ko je določeno območje koncentracije za preskušanje, je treba preskusno kemikalijo preskusiti z uporabo osmih logaritemskih koncentracij v ustreznih intervalih, kot je opredeljeno s predhodnim preskusom za določanje območja. Koncentracije, preskušene pri drugem in tretjem poskusu, je treba dodatno ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo, če je potrebno.

33. Razredčine preskusne kemikalije je treba pripraviti v ustreznem topilu (glej odstavek 25 Dodatka 3). Če najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v DMSO ali etanolu, z dodajanjem več topila pa bi koncentracija topila v končni epruveti presegla dopustno mejo, se lahko najvišja koncentracija zniža na naslednjo nižjo koncentracijo. V tem primeru se lahko dodatna koncentracija doda na spodnjem koncu niza koncentracij. Preostale koncentracije v nizu morajo ostati nespremenjene.

34. Raztopine preskusne kemikalije je treba ob dodajanju v preskusno jamico pazljivo spremljati, saj lahko preskusna kemikalija ob dodajanju v preskusno jamico obori. Podatke za vse jamice, ki vsebujejo oborino, je treba izključiti iz prileganja krivulje in navesti razlog za izključitev.

35. Če obstajajo predhodne informacije iz drugih virov, ki zagotavljajo log(IC_{50}) preskusne kemikalije, je morda ustrezno, da se razredčine geometrično razporedijo bližje okrog pričakovanega log(IC_{50}) (tj. 0,5 logaritemske enote). Iz končnih rezultatov mora biti razvidna zadostna razpršenost koncentracij na obeh straneh log(IC_{50}), vključno z zgornjo in spodnjo stranjo, tako da je mogoče ustrezno opredeliti krivuljo vezave.

Razporeditev na preskusni plošči

36. Pripraviti je treba označene mikrotitrske plošče, tako da se uporabijo šestkratne inkubacije za kontrolo s topilom, najvišja koncentracija referenčnega estrogena (E2), ki se uporablja tudi kot indikator nespecifične vezave (NSB), kontrola s pufrom, trikratne inkubacije za vsako od osmih koncentracij kontrole s snovjo, ki se ne veže (oktiltrietoksisilan), sedem nižjih koncentracij referenčnega estrogena (E2), osem koncentracij snovi, ki se veže šibko (noretinodrel ali noretindron), in osem koncentracij vsake preskusne kemikalije (TC). Primer diagrama razporeditve na plošči za celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole je naveden v preglednici 4 v nadaljevanju. Dodatne mikrotitrske plošče se uporabijo za preskusno kemikalijo in morajo vsebovati kontrole plošč, tj. (i) visoko (največje izpodrinjenje) ter srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom (kot celotno vezavo) in nespecifično vezavo, vsako v šestih ponovitvah (preglednica 5). Primer delovnega lista z razporeditvijo na mikrotitrski plošči za kompetitivni preskus z uporabo treh neznanih preskusnih kemikalij je naveden v Dodatku 3.3. Koncentracije, navedene na delovnem listu ter v preglednicah 4 in 5, se nanašajo na končne koncentracije, uporabljene v vsaki preskusni jamici. Največja koncentracija za E2 mora biti 1×10^{-7} M, za snov, ki se veže šibko, pa je treba uporabiti najvišjo koncentracijo, uporabljeno za snov, ki se veže šibko, na plošči 1. Koncentracijo IC_{50} mora določiti laboratorij na podlagi svoje zbirke podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov. Pričakuje se, da bo ta vrednost podobna tisti iz validacijskih študij (glej preglednico 1).

▼M8

Preglednica 4

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave [1] [2], celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (plošča 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontrola s pufrom in pozitivna kontrola (E2)			Šibka pozitivna (noretinodrel)			Negativna kontrola (OTES)			TB in NSB		
A	Slepi vzorec (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s topilom) (2,05–odstotni DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola s pufrom		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Slepi vzorec (za vroče) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Priprava vzorca za mikrotitrsko ploščo s standardi, ki jo je treba uporabiti pri vsakem poskusu.
([2]) Opozoriti je treba, da to mikrotitrsko ploščo sestavljajo razredčine, pripravljene na plošči za razredčine, opisani za standarde v prejšnjih oddelkih.
V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).
(*) Dejanski slepi vzorec, jamica se ne uporablja.
(**) Slepi vzorec se ne uporablja med inkubacijo, temveč se uporabi za potrditev skupne dodane radioaktivnosti.

Preglednica 5

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, dodatne plošče za preskusne kemikalije (TC) in kontrole plošč

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Preskusna kemikalija-1 (TC-1)			Preskusna kemikalija-2 (TC-2)			Preskusna kemikalija-3 (TC-3)			Kontrole		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s topilom)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

▼M8

Dokončanje preskusa kompetitivne vezave

37. Razen v jamice za celotno vezavo in slepe vzorce (za vroče), kot je prikazano v preglednici 6, je treba v vsako jamico dodati 50 µl analiznega pufra in ga zmešati z 10 µl kontrole s topilom, referenčnega estrogena (E2), snovi, ki se veže šibko, snovi, ki se ne veže, oziroma preskusnih kemikalij, 10 µl raztopine [3H]-17β-estradiola s koncentracijo 5 nM. Nato se na vsako ploščo doda 30 µl ledeno mrzle receptorske raztopine in narahlo premeša. Raztopina hrERα mora biti zadnji dodani reagent. Preskusne mikrotitrske plošče je treba dve uri inkubirati pri sobni temperaturi (22–28 °C).

Preglednica 6

Količina preskusnih elementov za preskus kompetitivne vezave hrER, mikrotitrske plošče

Koraki priprave		Jamice, razen tistih s TB	Jamice s TB	Slepi vzorec (za vroče)
Količina elementov za zgornje reakcijske jamice in vrstni red dodajanja	analizni pufer pri sobni temperaturi	50 µl	60 µl	90 µl
	neoznačen E2, snov, ki se veže šibko, snov, ki se ne veže, topilo in preskusne kemikalije (*)	10 µl	—	—
	[3H]-17β-estradiol, da se dobi končna koncentracija 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	koncentracija hrERα, kot je določena (glej odstavka 12 in 13)	30 µl	30 µl	—
Skupna količina v vsaki preskusni jamici		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Ustrezno pripravljeni, da se dobi končna koncentracija znotraj dopustne koncentracije topila.

38. Nato je treba izvesti kvantifikacijo [^{3}H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, po ločevanju [^{3}H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, od prostega [^{3}H]-17β-estradiola, tako da se v vsako jamico doda 100 µl ledeno mrzle raztopine DCC, kot je opisano v odstavkih 21–23 Dodatka 3 za preskus vezave z nasičenjem.

39. Jamice G10–12 in H10–12 (v preglednici 4 opredeljene kot slepi vzorec (za vroče)) predstavljajo razgradnje na minuto [^{3}H]-označenega-estradiola v 10 µl. 10 µl alikvota je treba dodati neposredno scintilacijski tekočini.

Merila za sprejemljivost

Preskus vezave z nasičenjem

40. Krivulja specifične vezave mora doseči stacionarno stanje, ko se uporabijo naraščajoče koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola, kar kaže na nasičenje hrERα z ligandom.

41. Specifična vezava pri 0,5 nM [3H]-17β-estradiola mora biti znotraj sprejemljivega razpona 30–50 % povprečne izmerjene skupne radioaktivnosti, dodane med ponovitvami. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi in preskus z nasičenjem ponoviti.

▼**M8**

42. Podatki morajo dati linearen Scatchardov diagram.

43. Nespecifična vezava ne sme biti prevelika. Vrednost za nespecifično vezavo mora običajno znašati < 35 % celotne vezave. Če se meri zelo nizka razgradnja na minuto za najnižjo koncentracijo radioaktivno označenega preskušenega 17β-estradiola, pa lahko količnik to mejno vrednost občasno preseže.

Preskus kompetitivne vezave

44. Naraščajoče koncentracije neoznačenega 17β-estradiola morajo izpodriniti [^{3}H]-17β-estradiol z receptorja na način, ki je skladen s kompetitivno vezavo na eno mesto.

45. Vrednost IC_{50} za referenčni estrogen (tj. 17β-estradiol) mora biti približno enaka molski koncentraciji [^{3}H]-17β-estradiola in Kd, določenemu na podlagi preskusa vezave z nasičenjem.

46. Celotna specifična vezava mora biti dosledno znotraj sprejemljivega razpona 40 ± 10 %, če je povprečna izmerjena koncentracija skupne radioaktivnosti, dodane vsaki jamici, med ponovitvami znašala 0,5 nM. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi.

47. Topilo ne sme spremeniti občutljivosti ali obnovljivosti preskusa. Rezultati kontrole s topilom (jamice TB) se primerjajo s kontrolo s pufrom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem. Če ni učinkov topila na preskus, morajo biti rezultati TB in kontrole s pufrom primerljivi.

48. Snov, ki se ne veže, ne sme izpodriniti več kot 25 % [^{3}H]-17β-estradiola s hrERα, ko se preskusi do 10^{-3} M (OTES) ali 10^{-4} M (DBP).

49. Merila za učinkovitost so bila razvita za referenčni estrogen in dve snovi, ki se vežeta šibko (npr. noretinodrel, noretindron), pri čemer so bili uporabljeni podatki iz validacijske študije za preskus vezave na hrER organizacije CERI (Priloga N k viru 2). 95-odstotni intervali zaupanja so določeni za srednjo vrednost ± standardni odklon (SD) (n) vseh kontrolnih ponovitev v štirih laboratorijih, ki so sodelovali v validacijski študiji. 95-odstotni intervali zaupanja so bili izračunani so bili za parametre prileganja krivulje (tj. vrh, dno, Hillov naklon, Log IC_{50}) za referenčni estrogen in snovi, ki se vežejo šibko, ter $\log_{10}$RBA snovi, ki se vežejo šibko, glede na referenčni estrogen. V preglednici 1 so določeni pričakovani razponi za parametre prileganja krivulje, ki se lahko uporabijo kot merila za učinkovitost. V praksi se lahko razpon IC_{50} nekoliko razlikuje, odvisno od eksperimentalno izpeljanega Kd pripravka receptorja in koncentracije liganda, ki se uporabi za preskus.

50. Zaradi najrazličnejših obstoječih potencialnih preskusnih kemikalij in razlik v potencialnih afinitetah in rezultatih (npr. celotna krivulja, delna krivulja, brez prileganja krivulje) merila učinkovitosti za parametre prileganja krivulje za preskusne kemikalije niso bila razvita. Vendar je treba pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo uporabiti strokovno presojo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne

▼M8

kemikalije, da se jasno opredeli vrh (npr. 90–100 % vezave) kompetitivne krivulje. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi nesočasnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Kontrole iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo se morajo približati meritvam učinkovitosti, sporočenim za ta preskus CERI, in biti v skladu s podatki posameznega laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov.

ANALIZA PODATKOV

Preskus vezave z nasičenjem

51. Izmerita se celotna vezava in nespecifična vezava. Iz teh vrednosti se izračuna specifična vezava naraščajočih koncentracij [^{3}H]-17β-estradiola v pogojih stacionarnega stanja, tako da se nespecifična vezava odšteje od celotne vezave. Graf specifične vezave v odvisnosti od koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola mora doseči stacionarno stanje za največjo specifično vezavo, značilno za nasičenje hrERα z [^{3}H]-17β-estradiolom. Poleg tega je treba z analizo podatkov dokumentirati vezavo [^{3}H]-17β-estradiola na eno samo vezavno mesto z visoko afiniteto. Na krivulji vezave z nasičenjem morajo biti prikazane nespecifična, skupna in specifična vezava. Pri nadaljnji analizi teh podatkov je treba uporabiti analizo nelinearne regresije (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s končnim prikazom podatkov v obliki Scatchardovega diagrama.

52. S podatkovno analizo je treba določiti Bmax in Kd zgolj na podlagi podatkov o celotni vezavi, pri čemer se domneva, da je nespecifična vezava linearna, razen če se utemelji uporaba druge metode. Poleg tega je treba pri določanju najboljšega prileganja uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Pri določanju Bmax in Kd na podlagi podatkov o vezavi z nasičenjem je treba vedno uporabiti popravek zaradi izgube liganda (npr. z uporabe metode po Swillensu, 1995).

Preskus kompetitivne vezave

53. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [^{3}H]-17β-estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log10) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki zavre 50 % največje specifične vezave [^{3}H]-17β-estradiola, je vrednost IC_{50}.

54. Ocene vrednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Vrh, dno, naklon in log(IC_{50}) je treba pri prileganju teh krivulj na splošno pustiti neomejene. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Popravek zaradi izgube liganda se ne sme uporabiti. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezno prileganje modelu. Relativno vezavno afiniteto (RBA) za snov, ki se veže šibko, je treba izračunati kot delež log (IC_{50}) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrol in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa iz odstavkov 44–49 tega dodatka 3.

▼M8

55. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Priporočljivo je, da se v zvezi z vsako ponovitvijo za preskusno kemikalijo sprva izvede standardizirana podatkovna analiza, enaka tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko (glej odstavek 54 tega dodatka 3). Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja deleža specifično vezanega [^{3}H]-17β-estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in skladnost parametrov prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno.

Razlaga podatkov

56. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se veže na hrERα, če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov pod 50 % (slika 1).

57. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se ne veže na hrERα, če:

— je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 % ali

— krivulje vezave ni mogoče prilagoditi in je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.

58. Preskusne kemikalije se štejejo za dvoumne, če ni izpolnjen nobeden od zgoraj navedenih pogojev (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

Preglednica 7

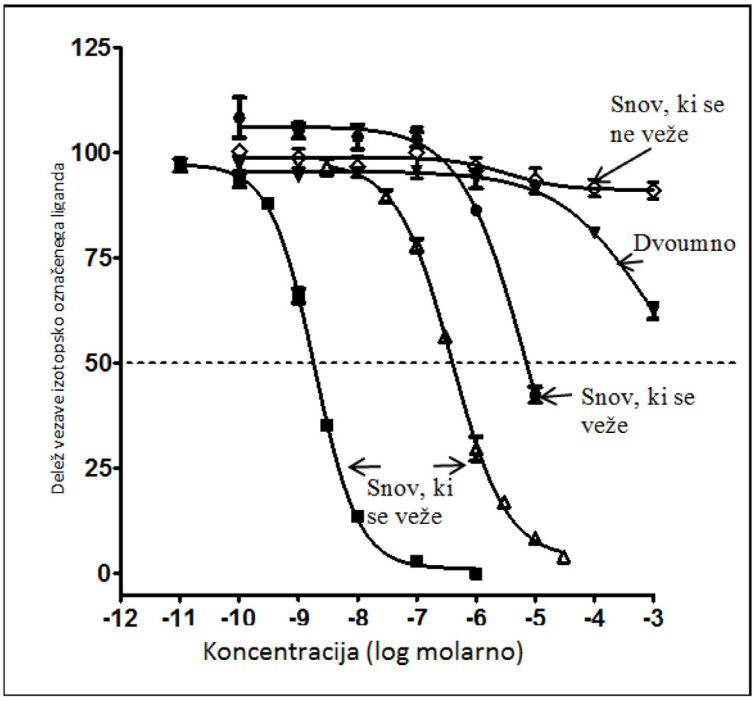
Merila za določitev razvrstitve na podlagi krivulje kompetitivne vezave za preskusno kemikalijo

Razvrstitev	Merila
Snov, ki se veže[a]	Krivuljo vezave je mogoče prilagoditi. **Najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov je pod 50 %.**
Snov, ki se ne veže[b]	Če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi, **je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 %.** Če krivulje vezave ni mogoče prilagoditi, **je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.**
Dvoumno[c]	Vsaka preskušena ponovitev, ki ni niti snov, ki se veže, niti snov, ki se ne veže (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

▼M8

Slika 1

Primeri razvrstitve preskusne kemikalije z uporabo krivulje kompetitivne vezave



59. V laboratoriju izvedene večkratne ponovitve za preskusno kemikalijo se združijo, tako da se vsaki ponovitvi dodelijo številčne vrednosti in se izračuna povprečje med ponovitvami, kot je prikazano v preglednici 8. Rezultati za združene ponovitve v posameznem laboratoriju se primerjajo s pričakovano razvrstitvijo za vsako preskusno kemikalijo.

Preglednica 8

Metoda za razvrstitev preskusne kemikalije z uporabo večkratnih ponovitev v laboratoriju

Za dodelitev vrednosti vsaki ponovitvi:	
Razvrstitev	**Številčna vrednost**
Snov, ki se veže	2
Dvoumno	1
Snov, ki se ne veže	0

Za razvrstitev povprečja številčne vrednosti med ponovitvami:

Razvrstitev	**Številčna vrednost**
Snov, ki se veže	povprečje ≥ 1,5
Dvoumno	0,5 ≤ povprečje < 1,5
Snov, ki se ne veže	povprečje < 0,5

POROČILO O PRESKUSU

60. Glej odstavek 24 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER“ te preskusne metode.

▼**M8**

Dodatek 3.1

SEZNAM IZRAZOV

[^{3}H]E2: 17β-estradiol, radioaktivno označen s tritijem

DCC: oglje, prevlečeno z dekstranom.

E2: neoznačen 17β-estradiol (inertni).

Analizni pufer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, ki vsebuje 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10-odstotni glicerol, 0,2 mM leupeptina, 1 mM ditiotreitola in 10 mg/ml govejega serumskega albumina.

hrERα: človeški rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena za vezavo liganda).

Ponovljeni vzorec: ena od več jamic, ki imajo enako vsebino pri enakih koncentracijah in se preskusijo sočasno v eni sami ponovitvi. V tem protokolu se vsaka koncentracija preskusne kemikalije preskusi v treh ponovitvah; to pomeni, da se pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije sočasno preskusijo trije ponovljeni vzorci.

Ponovitev: celoten sklop jamic pri sočasno izvedenem preskusu z mikrotitrsko ploščo, ki zagotavlja vse potrebne informacije za opredelitev vezave preskusne kemikalije na hrERα (tj. skupni [^{3}H]-17β-estradiol, dodan v preskusno jamico, največja vezava [^{3}H]-17β-estradiola na hrERα, nespecifična vezava in celotna vezava pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije). Ponovitev bi lahko sestavljala tudi ena sama preskusna jamica (tj. ponovljeni vzorec) na koncentracijo, ker pa ta protokol zahteva preskušanje v treh ponovitvah, eno ponovitev sestavljajo tri preskusne jamice na koncentracijo. Poleg tega ta protokol zahteva tri neodvisne (tj. nesočasne) ponovitve na kemikalijo.

▼**M8**

Dodatek 3.2

RAZPOREDITEV JAMIC ZA PRESKUS KOMPETITIVNE VEZAVE

Plošča	**Položaj**	**Ponovljeni vzorec**	**Vrsta jamice**	**Oznaka jamice**	**Oznaka koncentracije**	**Začetna koncentracija kompetitorja (M)**	**Zaloga hrER (µl)**	**Količina pufra (µl)**	**Količina sledila (vroč E2) (µL)**	**Količina s plošče z razredčinami (µL)**	**Končna količina (µl)**	**Končna koncentracija kompetitorja (M)**
trdno	A1	1	slepi vzorec	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
trdno	A2	2	slepi vzorec	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
trdno	A3	3	slepi vzorec	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
trdno	B1	1	hladen E2	trdno	S1	$1{,}00E^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-11}$
trdno	B2	2	hladen E2	trdno	S1	$1{,}00E^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-11}$
trdno	B3	3	hladen E2	trdno	S1	$1{,}00E^{-10}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-11}$
trdno	C1	1	hladen E2	trdno	S2	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
trdno	C2	2	hladen E2	trdno	S2	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
trdno	C3	3	hladen E2	trdno	S2	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
trdno	D1	1	hladen E2	trdno	S3	$3{,}16E^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-10}$
trdno	D2	2	hladen E2	trdno	S3	$3{,}16E^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-10}$
trdno	D3	3	hladen E2	trdno	S3	$3{,}16E^{-9}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-10}$
trdno	E1	1	hladen E2	trdno	S4	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	E2	2	hladen E2	trdno	S4	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	E3	3	hladen E2	trdno	S4	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	F1	1	hladen E2	trdno	S5	$3{,}16E^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-9}$
trdno	F2	2	hladen E2	trdno	S5	$3{,}16E^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-9}$
trdno	F3	3	hladen E2	trdno	S5	$3{,}16E^{-8}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-9}$
trdno	G1	1	hladen E2	trdno	S6	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	G2	2	hladen E2	trdno	S6	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	G3	3	hladen E2	trdno	S6	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	H1	1	hladen E2	trdno	S7	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	H2	2	hladen E2	trdno	S7	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	H3	3	hladen E2	trdno	S7	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	$3{,}16E^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-8}$
trdno	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	$3{,}16E^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-8}$
trdno	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	$3{,}16E^{-7}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-8}$
trdno	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	$3{,}16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-7}$
trdno	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	$3{,}16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-7}$
trdno	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	$3{,}16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-7}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	$3{,}16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-6}$
trdno	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	$3{,}16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-6}$
trdno	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	$3{,}16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-6}$
trdno	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	$3{,}16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-5}$
trdno	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	$3{,}16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-5}$
trdno	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	$3{,}16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3{,}2E^{-5}$
trdno	A7	1	OTES	NE	OTES1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
trdno	A8	2	OTES	NE	OTES1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
trdno	A9	3	OTES	NE	OTES1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
trdno	B7	1	OTES	NE	OTES2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	B8	2	OTES	NE	OTES2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	B9	3	OTES	NE	OTES2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
trdno	C7	1	OTES	NE	OTES3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	C8	2	OTES	NE	OTES3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	C9	3	OTES	NE	OTES3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
trdno	D7	1	OTES	NE	OTES4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	D8	2	OTES	NE	OTES4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	D9	3	OTES	NE	OTES4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
trdno	E7	1	OTES	NE	OTES5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	E8	2	OTES	NE	OTES5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	E9	3	OTES	NE	OTES5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	F7	1	OTES	NE	OTES6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
trdno	F8	2	OTES	NE	OTES6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
trdno	F9	3	OTES	NE	OTES6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
trdno	G7	1	OTES	NE	OTES7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
trdno	G8	2	OTES	NE	OTES7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
trdno	G9	3	OTES	NE	OTES7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
trdno	H7	1	OTES	NE	OTES8DB-P7	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
trdno	H8	2	OTES	NE	OTES88	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
trdno	H9	3	OTES	NE	OTES8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
trdno	A10	1	celotna vezava	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
trdno	A11	2	celotna vezava	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
trdno	A12	3	celotna vezava	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
trdno	B10	4	celotna vezava	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
trdno	B11	5	celotna vezava	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
trdno	B12	6	celotna vezava	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
trdno	C10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S1	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	C11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S2	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	C12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S3	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	D10	4	hladen E2 (visok)	NSB	S4	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	D11	5	hladen E2 (visok)	NSB	S5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	D12	6	hladen E2 (visok)	NSB	S6	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
trdno	E10	1	kontrola s pufrom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
trdno	E11	2	kontrola s pufrom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
trdno	E12	3	kontrola s pufrom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
trdno	F10	4	kontrola s pufrom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
trdno	F11	5	kontrola s pufrom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
trdno	F12	6	kontrola s pufrom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
trdno	G10 (*)	1	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H1	—	90	—	10	—	100	—
trdno	G11 (*)	2	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H2	—	90	—	10	—	100	—
trdno	G12 (*)	3	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H3	—	90	—	10	—	100	—
trdno	H10 (*)	4	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	H11 (*)	5	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H5	—	90	—	10	—	100	—
trdno	H12	6	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	neznano 1	U1	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A2	2	neznano 1	U1	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A3	3	neznano 1	U1	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	B1	1	neznano 1	U1	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B2	2	neznano 1	U1	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B3	3	neznano 1	U1	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	C1	1	neznano 1	U1	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C2	2	neznano 1	U1	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C3	3	neznano 1	U1	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	D1	1	neznano 1	U1	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D2	2	neznano 1	U1	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D3	3	neznano 1	U1	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	E1	1	neznano 1	U1	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E2	2	neznano 1	U1	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E3	3	neznano 1	U1	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F1	1	neznano 1	U1	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F2	2	neznano 1	U1	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F3	3	neznano 1	U1	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	G1	1	neznano 1	U1	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G2	2	neznano 1	U1	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G3	3	neznano 1	U1	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	H1	1	neznano 1	U1	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H2	2	neznano 1	U1	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	H3	3	neznano 1	U1	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	A4	1	neznano 2	U2	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A5	2	neznano 2	U2	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A6	3	neznano 2	U2	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	B4	1	neznano 2	U2	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B5	2	neznano 2	U2	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B6	3	neznano 2	U2	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	C4	1	neznano 2	U2	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C5	2	neznano 2	U2	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C6	3	neznano 2	U2	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	D4	1	neznano 2	U2	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D5	2	neznano 2	U2	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D6	3	neznano 2	U2	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	E4	1	neznano 2	U2	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E5	2	neznano 2	U2	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E6	3	neznano 2	U2	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F4	1	neznano 2	U2	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F5	2	neznano 2	U2	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F6	3	neznano 2	U2	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	G4	1	neznano 2	U2	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G5	2	neznano 2	U2	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G6	3	neznano 2	U2	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	H4	1	neznano 2	U2	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H5	2	neznano 2	U2	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H6	3	neznano 2	U2	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	A7	1	neznano 3	U3	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	A8	2	neznano 3	U3	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	A9	3	neznano 3	U3	1	$1{,}00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-10}$
P1	B7	1	neznano 3	U3	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B8	2	neznano 3	U3	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	B9	3	neznano 3	U3	2	$1{,}00E^{-8}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-9}$
P1	C7	1	neznano 3	U3	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C8	2	neznano 3	U3	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	C9	3	neznano 3	U3	3	$1{,}00E^{-7}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-8}$
P1	D7	1	neznano 3	U3	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D8	2	neznano 3	U3	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	D9	3	neznano 3	U3	4	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-7}$
P1	E7	1	neznano 3	U3	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E8	2	neznano 3	U3	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E9	3	neznano 3	U3	5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F7	1	neznano 3	U3	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F8	2	neznano 3	U3	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	F9	3	neznano 3	U3	6	$1{,}00E^{-4}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-5}$
P1	G7	1	neznano 3	U3	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G8	2	neznano 3	U3	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	G9	3	neznano 3	U3	7	$1{,}00E^{-3}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-4}$
P1	H7	1	neznano 3	U3	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H8	2	neznano 3	U3	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	H9	3	neznano 3	U3	8	$1{,}00E^{-2}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-3}$
P1	A10	1	kontrola E2 (max)	trdno	E2max1	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}00E^{-7}$
P1	A11	2	kontrola E2 (max)	trdno	E2max2	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}00E^{-7}$
P1	A12	3	kontrola E2 (max)	trdno	E2max3	$1{,}00E^{-6}$	30	50	10	10	100	$1{,}00E^{-7}$
P1	B10	1	kontrola E2 (IC50)	trdno	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	B11	2	kontrola E2 (IC50)	trdno	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	kontrola E2 (IC50)	trdno	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	kontrola NE (max)	trdno	nemax1	$1{,}00E^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}00E^{-4{,}5}$
P1	C11	2	kontrola NE (max)	trdno	nemax2	$1{,}00E^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}00E^{-4{,}5}$
P1	C12	3	kontrola NE (max)	trdno	nemax3	$1{,}00E^{-3{,}5}$	30	50	10	10	100	$1{,}00E^{-4{,}5}$
P1	D10	1	kontrola NE (IC50)	trdno	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	kontrola NE (IC50)	trdno	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	kontrola NE (IC50)	trdno	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S1	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S2	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	E12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S3	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F10	4	hladen E2 (visok)	NSB	S4	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F11	5	hladen E2 (visok)	NSB	S5	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	F12	6	hladen E2 (visok)	NSB	S6	$1{,}00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1{,}0E^{-6}$
P1	G10	1	celotna vezava	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	celotna vezava	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	celotna vezava	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (µl)	Količina pufra (µl)	Količina sledila (vroč E2) (µL)	Količina s plošče z razredčinami (µL)	Končna količina (µl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	H10	4	celotna vezava	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	celotna vezava	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	celotna vezava	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Opozoriti je treba, da so „vroče“ jamice med inkubacijo prazne. 10 µl se doda samo za scintilacijsko štetje.

▼**M8**

Dodatek 4

PREUDARKI ZA ANALIZO PODATKOV IZ PRESKUSA KOMPETITIVNE VEZAVE NA ČLOVEŠKI REKOMBINANTNI ESTROGENSKI RECEPTOR (HRER)

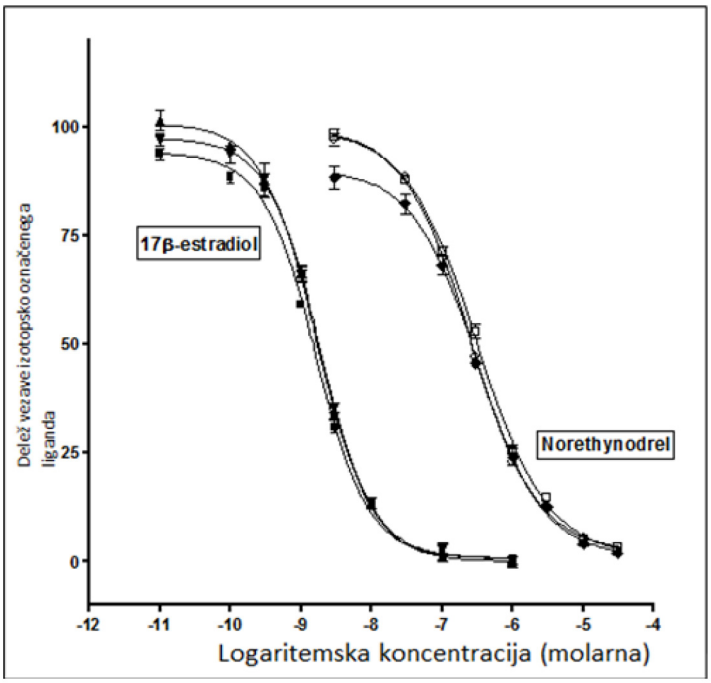
1. S preskusom kompetitivne vezave na hrERα se meri vezava ene same koncentracije [^{3}H]-17β-estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [^{3}H]-17β-estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log10) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki zavre 50 % največje specifične vezave [^{3}H]-17β-estradiola, je IC_{50}.

Podatkovna analiza za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko (1)

2. Podatki iz kontrolnih ponovitev se pretvorijo (tj. delež specifične vezave [^{3}H]-17β-estradiola in logaritemska koncentracija kontrolne koncentracije) za nadaljnjo analizo. Ocene vrednosti log(IC_{50}) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Vrh, dno, naklon in log(IC_{50}) lahko pri prileganju teh krivulj običajno ostanejo neomejeni. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Popravek zaradi izgube liganda za preskusa hrER FW ali CERI ni bil potreben, vendar se lahko po potrebi preuči. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezna prilagoditev modelu. Relativna vezavna afiniteta (RBA) za snov, ki se veže šibko, se lahko izračuna kot delež log (IC_{50}) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC_{50}) za 17β-estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa in meril za sprejemljivost, kot so opisana v tej preskusni metodi (odstavek 20), Dodatku 2 (preskus FW, odstavki 41–51) in Dodatku 3 (preskus CERI, odstavki 41–51). Primeri treh ponovitev za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, so prikazani na sliki 1.

Slika 1

Primeri krivulj kompetitivne vezave za referenčni estrogen in kontrolno snov, ki se veže šibko



▼M8

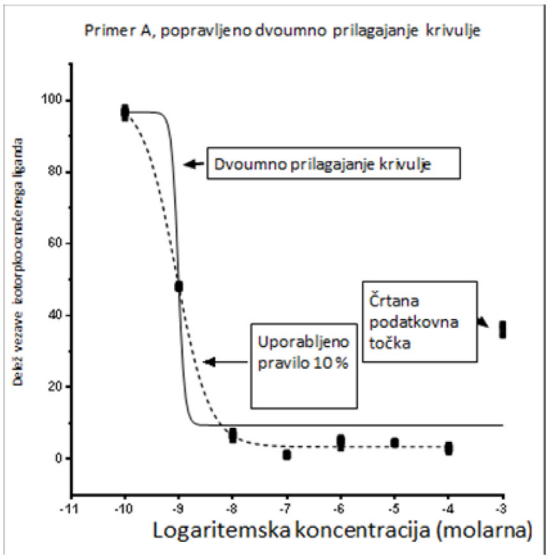
Podatkovna analiza za preskusne kemikalije

3. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Pri vsaki ponovitvi za preskusno kemikalijo je treba sprva izvesti standardizirano podatkovno analizo, enako tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko. Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja deleža specifično vezanega [^{3}H]-17β-estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji kemikalije in skladnost parametrov prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno. Pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo je treba uporabiti strokovno presojo, podatke, ki se uporabijo za razvrstitev vsake preskusne kemikalije med snovi, ki se vežejo, ali snovi, ki se ne vežejo, pa mora biti mogoče znanstveno utemeljiti.

4. Občasno se lahko pojavijo primeri podatkov, ki zahtevajo dodatno pozornost, da se podatki o vezavi na hrER ustrezno analizirajo in razlagajo. Prejšnje študije so pokazale na primere, ko se lahko analiza in razlaga podatkov o kompetitivni vezavi na receptor zapleteta zaradi zvišanja deleža specifične vezave, ko se kemikalije preskušajo pri najvišjih koncentracijah (slika 2). To je dobro znana težava, ki se pojavlja ob uporabi protokolov za številne preskuse kompetitivne vezave na receptor (3. V teh primerih je od koncentracije odvisen odziv opažen pri nižjih koncentracijah, ko pa se koncentracija preskusne kemikalije približa meji topnosti, se izpodrinjenje [^{3}H]17β-estradiola ne zmanjšuje več. V teh primerih podatki za višje koncentracije kažejo, da je bila dosežena biološka meja preskusa. Ta pojav je na primer pogosto povezan z netopnostjo in obarjanjem kemikalij pri visokih koncentracijah, lahko pa tudi odraža preseženo zmožnost oglja, prevlečenega z dekstranom, da prestreže nevezan radioaktivno označen ligand med postopkom ločevanja pri najvišjih koncentracijah kemikalije. Če se take podatkovne točke ne izključijo iz prilagajanja podatkov o kompetitivni vezavi sigmoidni krivulji, lahko včasih pride do napačne razvrstitve potenciala preskusne kemikalije za vezavo na ER (slika 2). Da bi se to preprečilo, protokol za preskuse vezave na hrER FW in CERI vključuje možnost, da se iz analiz izključijo podatkovne točke, pri katerih je srednja vrednost ponovljenih vzorcev za delež specifične vezave [^{3}H]17β-estradiola najmanj 10 % nad opaženim deležem srednje vrednosti pri nižji koncentraciji (tj. tako imenovano pravilo 10 %). To pravilo se lahko za dano krivuljo uporabi le enkrat; da se lahko krivulja ustrezno razvrsti, morajo ostati podatki za vsaj šest koncentracij.

Slika 2

Primeri krivulj kompetitivne vezave z uporabo pravila 10 % in brez nje

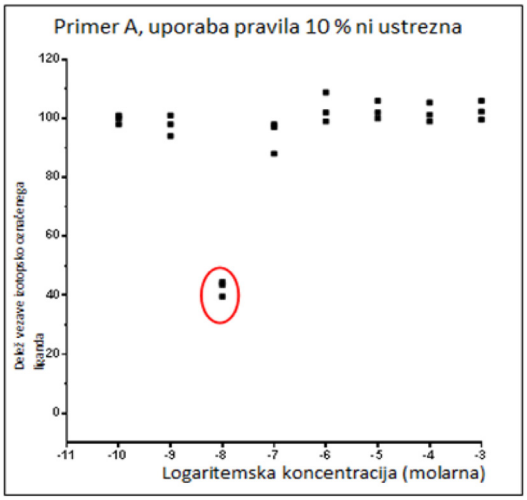


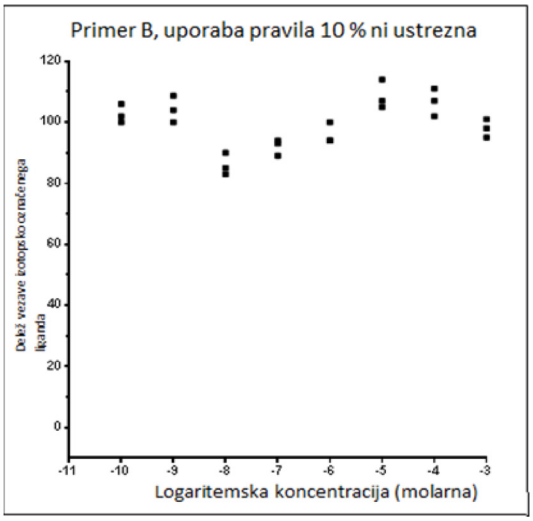
▼**M8**

5. Ustrezno uporabo pravila 10 % za popravek teh krivulj je treba skrbno pretehtati in pridržati za tiste primere, v katerih se z veliko verjetnostjo nakazuje, da gre za snov, ki se veže na hrER. Med izvajanjem poskusov za validacijsko študijo preskusa vezave na hrER FW je bilo opaženo, da ima pravilo 10 % včasih neželene in nepredvidene posledice. Kemikalije, ki niso reagirale z receptorjem (tj. snovi, ki se dejansko ne vežejo), so pogosto pokazale variabilnost pri 100-odstotni vezavi radioaktivno označenega liganda, ki je bila med različnimi preskušenimi koncentracijami več kot 10-odstotna. Če bi bila najnižja vrednost slučajno pri nizki koncentraciji, bi se podatki za vse višje koncentracije potencialno lahko črtali iz analize, tako da bi se uporabilo pravilo 10 %, čeprav bi bile zadevne koncentracije lahko koristne pri ugotavljanju, da je kemikalija snov, ki se ne veže. Na sliki 3 so prikazani primeri, v katerih uporaba pravila 10 % ni ustrezna.

Slika 3

Primeri podatkov o kompetitivni vezavi, pri katerih uporaba pravila 10 % ni ustrezna





▼**M8**

Viri

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 226), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) Motulsky, H., in Christopoulos, A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornija, str. 187–191. Www.graph-pad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws, S. C., Yavanhxay, S., Cooper, R. L., in Eldridge, J. C. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1): 46–56.

▼M8

B.71 **PRESKUSI *IN VITRO* ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE, S KATERIMI SE OBRAVNAVA KLJUČNI DOGODEK AKTIVACIJE DENDRITSKIH CELIC PRI POTEKU NEŽELENEGA IZIDA (AOP) ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE**

SPLOŠNI UVOD

Preskusna metoda za ključni dogodek aktivacije dendritskih celic

1. Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ([1]). Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Sedanje znanje o kemijskih in bioloških mehanizmih, povezanih s preobčutljivostjo kože, je bilo v okviru programa AOP OECD (2) povzeto kot potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) od začetnega dogodka na molekulski ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa. V tem primeru je začetni dogodek na molekulski ravni (tj. prvi ključni dogodek) kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože. Drugi ključni dogodek v tem poteku neželenega izida se odvija v keratinocitih ter vključuje vnetni odziv in spremembe v izražanju genov, povezanem s posebnimi potmi celičnega signaliziranja, kot so poti, odvisne od odzivnega elementa za antioksidante/elektrofile (ARE). Tretji ključni dogodek je aktivacija dendritskih celic (DC), ki se običajno ocenjuje z izražanjem posebnih celičnih površinskih označevalcev, tj. kemokinov in citokinov. Četrti ključni dogodek je aktivacija in proliferacija celic T, kar se posredno ocenjuje pri lokalni analizi bezgavk pri miših (LLNA) (3).

2. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 442E (2017). V njej so opisani preskusi *in vitro*, s katerimi se obravnavajo mehanizmi, opisani v okviru ključnega dogodka aktivacije dendritskih celic pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože (2). Preskusna metoda vključuje preskuse, ki jih je treba uporabiti v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN in uredbo CLP.

Preskusi, opisani v tej preskusni metodi, so:

— preskus aktivacije humane celične linije (h-CLAT);

— preskus aktivacije celične linije U937 (U-SENS™);

— preskus poročevalskega gena za interlevkin-8 (preskus IL-8 Luc).

3. Preskusi, vključeni v to preskusno metodo, in ustrezne smernice OECD za preskušanje se lahko razlikujejo glede postopka, uporabljenega za pridobitev podatkov in meritev, vendar se lahko enakovredno uporabljajo za obravnavanje zahtev držav za rezultate preskusov v zvezi s ključnim dogodkom aktivacije dendritskih celic pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

([1]) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

▼M8

Osnova in načela preskusov, vključenih v preskusno metodo, ki temelji na ključnem dogodku

4. Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, pri kateri se uporabljajo morski prašički, tj. Magnusson-Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GPMT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (4)), se ocenjuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitacije. Lokalna analiza bezgavk pri miših, LLNA (PM B.42) (3) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (5)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (6)), vse ocenjujejo le indukcijski odziv in so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.

5. Nedavno sta bili za prispevek k ocenjevanju nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože sprejeti preskusni metodi *in chemico* in *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih ter s katerima se obravnavata prvi ključni dogodek (PM B.59; neposredni preskus reaktivnosti peptidov (7)) in drugi ključni dogodek (PM B.60; luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2 (8)).

6. S preskusi, opisanimi v tej preskusni metodi, se kvantificirajo bodisi spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev, povezanih s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (npr. CD54, CD86), bodisi spremembe v izražanju IL-8, tj. citokina, povezanega z aktivacijo dendritskih celic. Poročalo se je, da povzročitelji preobčutljivosti kože sprožijo izražanje celičnih membranskih označevalcev, kot so CD40, CD54, CD80, CD83 in CD86, ter nastanek provnetnih citokinov, kot sta IL-1β in TNF-α, ter več kemokinov, vključno z IL-8 (CXCL8) in CCL3 (9) (10) (11) (12), povezanih z aktivacijo dendritskih celic (2).

7. Ker pa je aktivacija dendritskih celic le en ključni dogodek pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože (2) (13), informacije, pridobljene samo s preskusi, s katerimi se merijo označevalci aktivacije dendritskih celic, morda ne bodo zadostovale za ugotovitev obstoja ali neobstoja potenciala kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato se predlaga, naj se podatki, pridobljeni s preskusi, opisanimi v tej preskusni metodi, uporabijo v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, kadar se uporabijo v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), skupaj z drugimi ustreznimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki pri poteku neželenega izida preobčutljivosti kože, in nepreskusnih metod, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh (13). Primeri uporabe podatkov, pridobljenih s temi preskusi v okviru opredeljenih pristopov, tj. standardiziranih pristopov v zvezi s sklopom uporabljenih virov informacij in v zvezi s postopkom, uporabljenim za podatke za pridobitev napovedi, so bili objavljeni (13) ter se lahko uporabijo kot koristni elementi v okviru IATA.

8. Preskusov, opisanih v tej preskusni metodi, ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, za organe, ki uporabljajo ti neobvezni podkategoriji, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitivne rezultate, pridobljene s temi metodami, kot take mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

▼M8

9. Pojem „preskusna kemikalija“ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša ([1]), in ni povezan z uporabnostjo preskusov za preskušanje snovi iz ene sestavine, snovi z več sestavinami in/ali zmesi. Za zdaj so na voljo omejene informacije o uporabnosti preskusov za snovi z več sestavinami/zmesi (14) (15). Ne glede na to so preskusi tehnično ustrezni za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, pa je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen ([2]). Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Poleg tega je treba pri preskušanju snovi z več sestavinami ali zmesi upoštevati morebitno interferenco citotoksičnih sestavin z opaženimi odzivi.

VIRI

(1) Združeni narodi (ZN) (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Šesta revidirana izdaja.New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment (št. 168). Na voljo na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Poglavje B.42 te priloge: Lokalna analiza bezgavk.

(4) Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.

(5) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.

(6) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: BrdU-ELISA.

(7) Poglavje B.59 te priloge: Preobčutljivost kože *in chemico*: neposredni preskus reaktivnosti peptidov (DPRA).

(8) Poglavje B.60 te priloge: Preobčutljivost kože *in vitro*: luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2.

(9) Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271–96.

(10) Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., in Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841–7.

(11) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., in Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031–8.

([1]) Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju OECD sprejet dogovor, da bi bilo treba v novih in posodobljenih smernicah OECD za preskušanje pojem „preskusna kemikalija“, ki opisuje, kaj se preskuša, uporabljati dosledneje, kjer je to mogoče.

([2]) Ta stavek je bil predlagan in sprejet aprila 2014 na sestanku delovne skupine nacionalnih koordinatorjev za smernice za preskušanje.

▼**M8**

(12) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., in Tagami, H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390–8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment (št. 256): Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

▼M8

Dodatek 1

PREOBČUTLJIVOST KOŽE IN VITRO: PRESKUS AKTIVACIJE HUMANE CELIČNE LINIJE (H-CLAT)

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. S preskusom h-CLAT se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev, povezanih s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic (DC) (tj. CD86 in CD54), v celični liniji humane monocitne levkemije THP-1 po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1) (2). Izmerjene ravni izražanja celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54 se nato uporabijo za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.

2. Preskus h-CLAT je bil ocenjen v validacijski študiji pod vodstvom Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) in z naknadnim neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki ga je izvedel Znanstveni svetovalni odbor (ESAC) EURL ECVAM. Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov je EURL ECVAM (3) uporabo preskusa h-CLAT priporočil v okviru IATA za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. Primeri uporabe podatkov preskusa h-CLAT v povezavi z drugimi informacijami so navedeni v virih (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Izkazalo se je, da se lahko preskus h-CLAT prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in analizo s pretočno citometrijo. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu, je v enem in več laboratorijih 80-odstotna (3) (12). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (13) in drugimi objavljenimi študijami (14), na splošno kažejo, da je v primerjavi z rezultati LLNA točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 85-odstotna (N = 142), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (94/101), specifičnost pa 66-odstotna (27/41) (na podlagi ponovne analize, ki jo je izvedel EURL ECVAM (12), ob upoštevanju vseh obstoječih podatkov in brez upoštevanja negativnih rezultatov za kemikalije z vrednostjo log Kow, večjo od 3,5, kot je opisano v odstavku 4). Lažno negativne napovedi pri preskusu h-CLAT se bodo bolj verjetno nanašale na kemikalije z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot na kemikalije z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (4) (13) (15). Vse te informacije skupaj kažejo, da metoda h-CLAT uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus h-CLAT kot samostojni preskus zgolj okvirne, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA in druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.

4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se metoda h-CLAT lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (3) (14) (15). Metoda h-CLAT se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila/vehikla v različne faze) v ustreznem topilu/vehiklu (glej odstavek 14). Preskusne kemikalije z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, običajno dajo lažno negativne rezultate (14). Zato se negativni rezultati, pridobljeni s preskusnimi kemikalijami z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, ne bi smeli upoštevati. Pozitivni rezultati, pridobljeni s preskusnimi kemikalijami z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, pa bi se še vedno lahko uporabili za

▼M8

podporo opredelitvi preskusne kemikalije kot povzročitelja preobčutljivosti kože. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti uporabljene celične linije (16) ter poskusnih pogojev pri prohaptenih (tj. snoveh, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450) in prehaptenih (tj. snoveh, aktiviranih z oksidacijo), zlasti pri tistih s počasno oksidacijo, prav tako pojavijo negativni rezultati v preskusu h-CLAT (15). Fluorescentne preskusne kemikalije se lahko ocenjujejo s preskusom h-CLAT (17), vendar bodo močne fluorescentne preskusne kemikalije, ki svetlobo oddajajo na isti valovni dolžini kot fluorescein izotiocianat (FITC) ali propidijev jodid (PI), vplivale na zaznavanje s pretočno citometrijo, zato jih z uporabo protiteles, konjugiranih s FITC, ali PI ni mogoče pravilno oceniti. V takem primeru se lahko uporabijo druga s fluorokromom označena protitelesa oziroma drugi označevalci citotoksičnosti, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC označena protitelesa (glej odstavek 24) ali PI (glej odstavek 18), npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 1.2.Glede na navedeno je treba negativne rezultate razlagati v okviru navedenih omejitev in skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA. Kadar obstajajo dokazi, da metode h-CLAT ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta metoda zanje ne bi smela uporabiti.

5. Kot je navedeno zgoraj, metoda h-CLAT podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (4) (5) (9). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi lahko rezultati preskusa h-CLAT prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti.

6. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.1.

NAČELO PRESKUSA

7. Metoda h-CLAT je preskus *in vitro*, s katerim se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev (tj. CD86 in CD54) na celični liniji humane monocitne levkemije, tj. celicah THP-1, po 24-urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Te površinske molekule so tipični označevalci aktivacije monocitnih celic THP-1 in lahko posnemajo aktivacijo dendritskih celic, ki ima ključno vlogo pri označevanju celic T. Spremembe v izražanju površinskih označevalcev se merijo s pretočno citometrijo po obarvanju celic s protitelesi, označenimi s fluorokromom. Sočasno se izvede tudi meritev citotoksičnosti, da se oceni, ali se pri subcitotoksičnih koncentracijah pojavi povečano izražanje površinskih označevalcev. Izračuna se relativna intenziteta fluorescence površinskih označevalcev v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom in uporabi v napovednem modelu (glej odstavek 26) za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

8. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 11) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavke od 20 do 22), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

▼M8

POSTOPEK

9. Ta preskus temelji na protokolu št. 158 storitve za podatkovne zbirke o alternativnih metodah namesto poskusov na živalih (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)) za preskus h-CLAT (18), tj. protokolu, ki se uporablja v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM. Priporočljivo je, da se ta protokol uporablja pri izvajanju in uporabi metode h-CLAT v laboratoriju. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki za metodo h-CLAT, ki vključuje dva koraka: *poskus za ugotavljanje odmerka* in *meritev izražanja CD86/CD54.*

Priprava celic

10. Za izvedbo metode h-CLAT je treba uporabiti celično linijo humane monocitne levkemije, THP-1. Priporočljivo je, da se celice (TIB-202™) pridobijo iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection.

11. Celice THP-1 se gojijo pri 37°C v navlaženi atmosferi s 5 % CO_2 v gojišču RPMI-1640, dopolnjenem z 10 % fetusnega seruma goveda (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanola, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina. Uporabi penicilina in streptomicina v gojišču se je mogoče izogniti. Vendar morajo v takem primeru uporabniki preveriti, da odsotnost antibiotikov v gojišču ne vpliva na rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2. Vsekakor je treba za zmanjšanje tveganja kontaminacije upoštevati dobre prakse na področju gojenja celičnih kultur ne glede na prisotnost ali odsotnost antibiotikov v gojišču za celične kulture. Celice THP-1 se rutinsko nasadijo na 2 do 3 dni z gostoto od 0,1 do $0{,}2 \times 10^6$ celic/ml. Vzdrževati jih je treba pri gostoti od 0,1 do $1{,}0 \times 10^6$ celic/ml. Preden se celice uporabijo za preskus, jih je treba kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. Reaktivnost celic je treba preveriti z uporabo pozitivnih kontrol, tj. 2,4-dinitroklorobenzena (DNCB) (št. CAS 97-00-7, z ≥ 99-odstotno čistostjo) in nikljevega sulfata ($NiSO_4$) (št. CAS 10101-97-0, z ≥ 99-odstotno čistostjo), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (št. CAS 50-21-5, z ≥ 85-odstotno čistostjo), dva tedna po odtajanju. DNCB in $NiSO_4$ morata povzročiti pozitiven odziv obeh celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54, LA pa mora povzročiti negativen odziv obeh celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54. Za poskus se uporabijo samo celice, ki so uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Celice se lahko namnožujejo do dva meseca po odtajanju. Število pasaž ne bi smelo presegati 30. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 20 do 24.

12. Za preskušanje se celice THP-1 nasadijo z gostoto bodisi $0{,}1 \times 10^6$ celic/ml bodisi $0{,}2 \times 10^6$ celic/ml in predhodno 72 ur oziroma 48 ur gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur. Pomembno je, da je gostota celic v stekleni̇čki za gojenje celičnih kultur takoj po obdobju predhodnega gojenja v vsakem poskusu čim bolj konsistentna (z uporabo enega od dveh zgoraj opisanih pogojev predhodnega gojenja), ker bi lahko gostota celic v stekleni̇čki za gojenje celičnih kultur takoj po predhodnem gojenju vplivala na izražanje CD86/CD54, ki ga povzročijo alergeni (19). Na dan preskusa se celice, odvzete iz stekleničke za gojenje celičnih kultur, ponovno suspendirajo v svežem gojišču z gostoto 2×10^6 celic/ml. Nato se celice nanesejo na 24-jamično ploščo z ravnim dnom (500 µl, 1×10^6 celic/jamico) ali 96-jamično ploščo z ravnim dnom (80 µl, $1{,}6 \times 10^5$ celic/jamico).

Poskus za ugotavljanje odmerka

13. *Poskus za ugotavljanje odmerka* se izvede za določitev CV75, ki je koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je viabilnost celic (CV) 75-odstotna v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom. Vrednost CV75 se uporabi za določitev koncentracije preskusnih kemikalij za meritev izražanja *CD86/CD54* (glej odstavke od 20 do 24).

▼**M8**

Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

14. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za metodo h-CLAT se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo (glej tudi odstavek 4) v fiziološki raztopini ali gojišču kot prvih možnostih topila/vehikla ali dimetil sulfoksidu (DMSO, z ≥ 99-odstotno čistostjo) kot drugi možnosti topila/vehikla, če preskusna kemikalija ni topna ali ne tvori stabilne disperzije v prejšnjih dveh topilih/vehiklih, do končnih koncentracij 100 mg/ml (v fiziološki raztopini ali gojišču) ali 500 mg/ml (v DMSO). Poleg zgoraj opisanih topil/vehiklov se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev. Upoštevati je treba stabilnost preskusne kemikalije v končnem topilu/vehiklu.

15. Začenši s 100 mg/l (v fiziološki raztopini ali gojišču) ali 500 mg/ml (v DMSO) osnovnimi raztopinami preskusnih kemikalij je treba izvesti naslednje korake za redčenje:

— za fiziološko raztopino ali gojišče kot topilo/vehikel: pripravi se osem osnovnih raztopin (osem koncentracij) z zaporednimi dvakratnimi redčenji z uporabo ustreznega topila/vehikla. Te osnovne raztopine se nato nadalje 50-kratno razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Če najvišja končna koncentracija na plošči, ki znaša 1 000 μg/ml, ni toksična, je treba največjo koncentracijo znova določiti, tako da se izvede nov preskus citotoksičnosti. Končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000 μg/ml za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v fiziološki raztopini ali gojišču;

— za DMSO kot topilo/vehikel: pripravi se osem osnovnih raztopin (osem koncentracij) z zaporednimi dvakratnimi redčenji z uporabo ustreznega topila/vehikla. Te osnovne raztopine se nato nadalje 250-kratno razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 1 000 μg/ml, tudi če ta koncentracija ni toksična.

Delovne raztopine se nazadnje uporabijo za izpostavljenost, tako da se količini suspenzije celic THP-1 na plošči doda enaka količina delovne raztopine (glej tudi odstavek 17), da se doseže nadaljnja dvakratna razredčina (običajno je končni razpon koncentracij na plošči od 7,81 do 1 000 μg/ml).

16. Kontrola s topilom/vehiklom, uporabljena pri metodi h-CLAT, je gojišče (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane (glej odstavek 4) v gojišču ali fiziološki raztopini) ali DMSO (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v DMSO), ki se preskusi pri enotni končni koncentraciji na plošči v višini 0,2 %. Za kontrolo se uporabi enako redčenje, kot je opisano za delovne raztopine v odstavku 15.

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

17. Gojišče ali delovne raztopine, opisani v odstavkih 15 in 16, se zmešajo v razmerju 1: 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na 24- ali 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 12). Obdelane plošče se nato inkubirajo 24 ± 0,5 ure pri 37°C v prisotnosti 5 % CO_2. Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusnimi kemikalijami, npr. z zatesnitvijo plošče pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami (20).

▼M8

Barvanje s propidijevim jodidom (PI)

18. Po 24 ± 0,5-urni izpostavljenosti se celice prenesejo v epruvete za vzorce in zberejo s centrifugiranjem. Supernatanti se zavržejo, preostale celice pa znova suspendirajo z 200 µl (v primeru 96 jamic) ali 600 µl (v primeru 24 jamic) fosfatnega pufra s soljo, ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina (pufer za barvanje). 200 µl suspenzije celic se prenese na 96-jamično ploščo z ukrivljenim dnom (v primeru 96 jamic) ali v mikroepruveto (v primeru 24 jamic) ter dvakrat spere z 200 µl (v primeru 96 jamic) ali 600 µl (v primeru 24 jamic) pufra za barvanje. Nazadnje se celice znova suspendirajo v pufru za barvanje (npr. 400 µl), nato se doda raztopina PI (npr. 20 µl) (na primer končna koncentracija PI je 0,625 µg/ml). Uporabijo se lahko tudi drugi označevalci citotoksičnosti, kot so 7-aminoactinomicin D (7-AAD), tripan modro ali drugi, če je mogoče dokazati, da alternativna barvila zagotavljajo podobne rezultate kot PI, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2.

Merjenje citotoksičnosti s pretočno citometrijo in ocena vrednosti CV75

19. Vnos PI se analizira s pretočno citometrijo z merilnim kanalom FL-3. Pridobi se skupaj 10 000 živih celic (negativni PI). Viabilnost celic se lahko izračuna z naslednjo enačbo v citometrijskem analiznem programu. Kadar je viabilnost celic majhna, je treba pridobiti do 30 000 celic, vključno z mrtvimi celicami. Alternativno se lahko podatki zajemajo eno minuto po začetku analize.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Vrednost CV75 (glej odstavek 13), tj. koncentracija, pri kateri se pokaže 75-odstotno preživetje celic THP-1 (25-odstotna citotoksičnost), se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

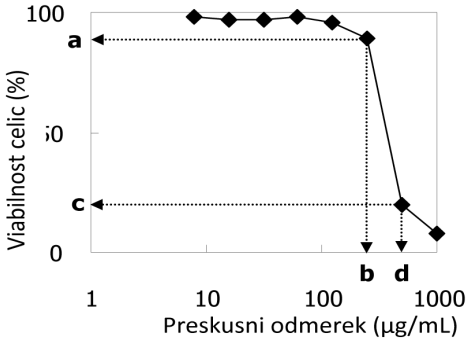
pri čemer je:

a najnižja vrednost viabilnosti celic nad 75 %,

c najvišja vrednost viabilnosti celic pod 75 %,

b in d sta koncentraciji, pri katerih se pokaže vrednost viabilnosti celic a oziroma c.

▼**M8**



Za pridobitev CV75 se lahko uporabijo tudi drugi pristopi, če se dokaže, da to ne vpliva na rezultate (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti).

Meritev izražanja CD86/CD54

Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

20. Uporabi se ustrezno topilo/vehikel (fiziološka raztopina, gojišče ali DMSO; glej odstavek 14), da se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo. Preskusne kemikalije se najprej razredčijo do koncentracije, ki ustreza 100-kratniku (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali 500-kratniku (za DMSO) 1,2 x CV75, določeni v *poskusu za ugotavljanje odmerka* (glej odstavek 19). Če CV75 ni mogoče določiti (tj. če v *poskusu za ugotavljanje odmerka* ni ugotovljena zadostna citotoksičnost), je treba kot začetno koncentracijo uporabiti najvišjo raztopljeno ali stabilno dispergirano koncentracijo preskusne kemikalije, pripravljeno z vsakim topilom/vehiklom. Opozoriti je treba, da končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000 µg/ml (v primeru fiziološke raztopine ali gojišča) ali 1 000 µg/ml (v primeru DMSO). Nato se izvedejo zaporedna 1,2-kratna redčenja z uporabo ustreznega topila/vehikla, da se pridobijo osnovne raztopine (osem koncentracij od 100 × 1,2 × CV75 do 100 × 0,335 × CV75 (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali od 500 × 1,2 × CV75 do 500 × 0,335 × CV75 (za DMSO)), ki se preskusijo v metodi h-CLAT (za primer načrta odmerjanja glej protokol DB-ALM št. 158). Osnovne raztopine se nato nadalje 50-kratno (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali 250-kratno (za DMSO) razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Te delovne raztopine se nazadnje uporabijo za izpostavljenost z nadaljnjim končnim dvakratnim faktorjem redčenja na plošči. Če rezultati ne izpolnjujejo meril za sprejemljivost, opisanih v odstavkih 29 in 30 v zvezi z viabilnostjo celic, se lahko *poskus za ugotavljanje odmerka* ponovi, da se določi natančnejša vrednost CV75. Upoštevati je treba, da se lahko za meritev izražanja CD86/CD54 uporabijo samo 24-jamične plošče.

21. Kontrola s topilom/vehiklom se pripravi, kot je opisano v odstavku 16. Pozitivna kontrola, uporabljena pri metodi h-CLAT, je DNCB (glej odstavek 11), za katerega se osnovne raztopine pripravijo v DMSO in razredčijo, kot je opisano za osnovne raztopine v odstavku 20. DNCB je treba kot pozitivno kontrolo za *meritev izražanja CD86/CD54* uporabiti pri enotni končni koncentraciji na plošči (običajno 4,0 µg/ml). Za pridobitev koncentracije DNCB na plošči, ki znaša 4,0 µg/ml, se pripravi 2 mg/ml osnovna raztopina DNCB v DMSO in nadalje 250-krat razredči z gojiščem v 8 µg/ml delovno raztopino. Alternativno se lahko kot koncentracija pozitivne kontrole uporabi

▼M8

tudi CV75 DNCB, ki se določi v vsakem preskuševalnem laboratoriju. Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Pri pozitivnih kontrolah enotna končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000 μg/ml (v primeru fiziološke raztopine ali gojišča) ali 1 000 μg/ml (v primeru DMSO). Merila za sprejemljivost ponovitev so enaka kot merila, opisana za preskusno kemikalijo (glej odstavek 29), razen zadnjega merila za sprejemljivost, saj se pozitivna kontrola preskusi pri eni sami koncentraciji.

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrolno snov je potreben en poskus za pridobitev napovedi. Vsak poskus je sestavljen iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev za *meritev izražanja CD86/CD54* (glej odstavke od 26 do 28). Vsaka neodvisna ponovitev se izvede na drug dan ali isti dan, če se za vsako ponovitev: (a) pripravijo neodvisne sveže osnovne raztopine in delovne raztopine preskusne kemikalije ter raztopine protiteles in (b) uporabijo neodvisno odvzete celice (npr. celice se odvzamejo iz različnih stekleničk za gojenje celičnih kultur); celice lahko sicer izhajajo iz iste pasaže. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi, pripravljene kot delovne raztopine (500 μl), se zmešajo s 500 μl suspendiranih celic (1 x 10^6 celic) v razmerju 1: 1, nato se celice inkubirajo 24 ± 0,5 ure, kot je opisano v odstavkih 20 in 21. Pri vsaki ponovitvi zadostuje en sam ponovljen vzorec za vsako koncentracijo preskusne kemikalije in kontrolne snovi, saj se napoved pridobi iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev.

Barvanje celic in analiza

23. Po 24 ± 0,5-urni izpostavljenosti se celice s 24-jamične plošče prenesejo v epruvete za vzorce, zberejo s centrifugiranjem in nato dvakrat sperejo z 1 ml pufra za barvanje (po potrebi se lahko opravijo dodatna spiranja). Po spiranju se celice blokirajo s 600 μl raztopine za blokiranje (pufer za barvanje, ki vsebuje 0,01 % (w/v) globulina (Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ali enakovreden)) in 15 minut inkubirajo pri 4°C. Po blokiranju se celice razdelijo v tri alikvote po 180 μl na 96-jamično ploščo z ukrivljenim dnom ali v mikroepruveto.

24. Po centrifugiranju se celice 30 minut barvajo s 50 μl s FITC označenih protiteles anti-CD86, anti-CD54 ali mišjih protiteles (izotipa) IgG1 pri 4°C. Protitelesa, opisana v protokolu h-CLAT DB-ALM št. 158 (18), je treba uporabiti tako, da se razredčijo v razmerju 3: 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ali v razmerju 3: 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) in IgG1 (DAKO, #X0927)) s pufrom za barvanje. Te faktorje redčenja protiteles so razvijalci preskusov opredelili kot faktorje, ki zagotavljajo najboljše razmerje med signalom in šumom. Na podlagi izkušenj razvijalcev preskusov je intenziteta fluorescence protiteles med različnimi serijami običajno konsistentna. Vendar lahko uporabniki razmislijo o titraciji protiteles v pogojih lastnega laboratorija, da se opredelijo najboljše koncentracije za uporabo. Uporabijo se lahko tudi druga s fluorokromom označena protitelesa anti-CD86 in/ali anti-CD54, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC konjugirana protitelesa, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 1.2. Opozoriti je treba, da lahko sprememba klona ali dobavitelja protiteles, kot so opisana v protokolu h-CLAT DB-ALM št. 158 (18), vpliva

▼M8

na rezultate. Po vsaj dvakratnem spiranju s 150 µl pufra za barvanje se celice znova suspendirajo v pufru za barvanje (npr. 400 µl), nato se doda raztopina PI (npr. 20 µl za pridobitev končne koncentracije 0,625 µg/ml) ali druga raztopina označevalca citotoksičnosti (glej odstavek 18). Ravni izražanja CD86 in CD54 ter viabilnost celic se analizirajo s pretočno citometrijo.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

25. Izražanje CD86 in CD54 se analizira s pretočno citometrijo z merilnim kanalom FL-1. Na podlagi geometrijske srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) se relativna intenziteta fluorescence (RFI) CD86 in CD54 za celice pozitivne kontrole in celice, tretirane s kemikalijo, izračuna v skladu z naslednjo enačbo:

$$RFI = \frac{MFI\ of\ chemical\text{–}treated\ cell - MFI\ of\ chemical\text{–}treated\ isotype\ control\ cells}{MFI\ of\ solvent/vehicle\text{–}treated\ ctrl\ cells - MFI\ of\ solvent/vehicle\text{–}treated\ isotype\ ctrl\ cells} \times 100$$

Tudi viabilnost celic iz izotipske kontrole (ki so obarvane z mišjimi protitelesi (izotipa) IgG1) se izračuna v skladu z enačbo, opisano v odstavku 19.

Napovedni model

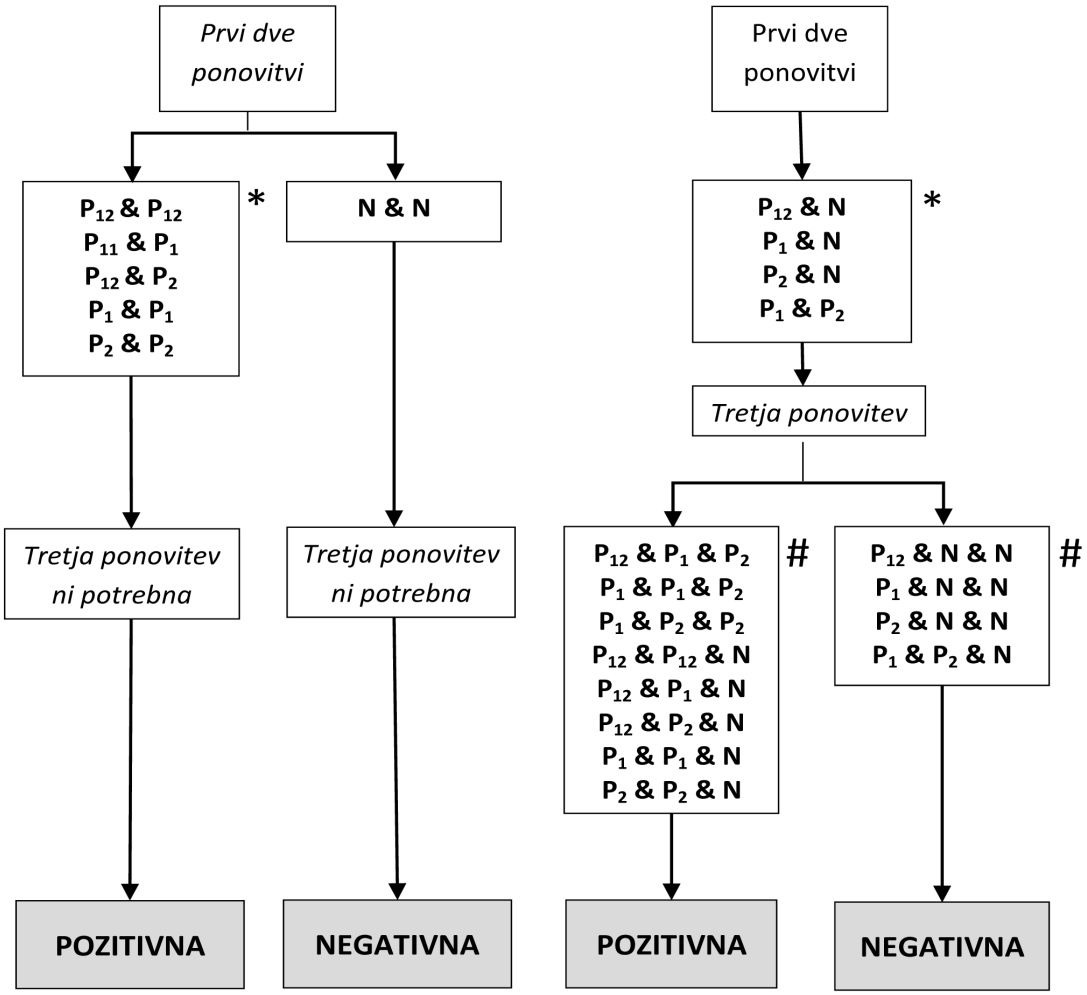
26. Za meritev izražanja *CD86/CD54* se vsaka preskusna kemikalija preskusi v najmanj dveh neodvisnih ponovitvah, iz katerih se izpelje ena sama napoved (POZITIVNA ali NEGATIVNA). Napoved h-CLAT se obravnava kot POZITIVNA, če je izpolnjen vsaj eden od naslednjih pogojev v dveh od dveh ali v vsaj dveh od treh neodvisnih ponovitev, v nasprotnem primeru se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA (slika 1):

— RFI CD86 je enaka ali večja od 150 % pri kateri koli preskušeni koncentraciji (z viabilnostjo celic ≥ 50 %);

— RFI CD54 je enaka ali večja od 200 % pri kateri koli preskušeni koncentraciji (z viabilnostjo celic ≥ 50 %).

27. Če sta obe prvi ponovitvi za CD86 in/ali CD54 pozitivni, se glede na navedeno napoved h-CLAT obravnava kot POZITIVNA in tretje ponovitve ni treba izvesti. Prav tako velja, da se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA (ob ustreznem upoštevanju določb odstavka 30), ne da bi bilo treba izvesti tretjo ponovitev, če sta prvi ponovitvi negativni za oba označevalca. Če pa prvi ponovitvi nista skladni pri vsaj enem označevalcu (CD54 ali CD86), je potrebna tretja ponovitev, pri čemer končna napoved temelji na večinskem rezultatu treh posameznih ponovitev (tj. dveh od treh). V zvezi s tem je treba navesti, da je tretja ponovitev potrebna, če se izvedeta dve neodvisni ponovitvi in je ena pozitivna samo za CD86 (v nadaljnjem besedilu: P_1), druga pa samo za CD54 (v nadaljnjem besedilu: P_2). Če je ta tretja ponovitev negativna za oba označevalca (v nadaljnjem besedilu: N), se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA. Če pa je ta tretja ponovitev pozitivna za kateri koli označevalec (P_1 ali P_2) ali za oba označevalca (v nadaljnjem besedilu: P_{12}), se napoved h-CLAT obravnava kot POZITIVNA.

▼**M8**



Slika 1: Napovedni model, uporabljen pri metodi h-CLAT Napoved h-CLAT je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda.

P_1: ponovitev, pozitivna samo za CD86; P_2: ponovitev, pozitivna samo za CD54; P_{12}: ponovitev, pozitivna za CD86 in CD54; N: ponovitev, ki ni pozitivna niti za CD86 niti za CD54.

* V okencih so prikazane ustrezne kombinacije rezultatov iz prvih dveh ponovitev, neodvisno od vrstnega reda, v katerem so pridobljeni.

V okencih so prikazane ustrezne kombinacije rezultatov iz treh ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih dveh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu, vendar ne izražajo vrstnega reda, v katerem so pridobljeni.

28. Za preskusne kemikalije, ki so z metodo h-CLAT napovedane kot POZITIVNE, se lahko neobvezno določita vrednosti učinkovitih koncentracij (EC), in sicer EC150 za CD86 in EC200 za CD54, tj. koncentracije, pri kateri so preskusne kemikalije povzročile RFI 150 ali 200. Ti vrednosti EC lahko potencialno prispevata k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (9), kadar se uporabita v celostnih pristopih, kot je IATA (4) (5) (6) (7) (8). Izračunata se lahko z naslednjima enačbama:

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

pri čemer je:

A_{conc} najnižja koncentracija v μg/ml z RFI > 150 (CD86) ali 200 (CD54),

B_{conc} najvišja koncentracija v μg/ml z RFI < 150 (CD86) ali 200 (CD54),

A_{RFI} RFI pri najnižji koncentraciji z RFI > 150 (CD86) ali 200 (CD54),

B_{RFI} RFI pri najvišji koncentraciji z RFI < 150 (CD86) ali 200 (CD54).

Za natančnejšo izpeljavo vrednosti EC150 in EC200 bodo morda potrebne tri neodvisne ponovitve za *meritev izražanja CD86/CD54*. Končni vrednosti EC150 in EC200 se nato določita kot mediana vrednosti EC, izračunanih iz treh neodvisnih ponovitev. Kadar samo dve od treh neodvisnih ponovitev izpolnjujeta merila za pozitivnost (glej odstavka 26 in 27), se sprejme višja vrednost EC150 ali EC200 od dveh izračunanih vrednosti.

Merila za sprejemljivost

29. Pri uporabi metode h-CLAT morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost (22) (27).

— Viabilnost celic v gojišču in kontrolah s topilom/vehiklom mora biti več kot 90-odstotna.

— Pri kontroli s topilom/vehiklom vrednosti RFI za CD86 in CD54 ne bi smele presegati pozitivnih meril (RFI CD86 ≥ 150 % in RFI CD54 ≥ 200 %). Vrednosti RFI kontrole s topilom/vehiklom se izračunajo s formulo, opisano v odstavku 25 („MFI kemikalije“ se nadomesti z „MFI topila/vehikla“, „MFI topila/vehikla“ pa se nadomesti z „MFI kontrole (z gojiščem)“).

— Tako pri kontroli z gojiščem kot pri kontroli s topilom/vehiklom mora biti razmerje MFI CD86 in CD54 v primerjavi z izotipsko kontrolo > 105 %.

— Pri pozitivni kontroli (DNCB) morajo vrednosti RFI tako CD86 kot tudi CD54 izpolnjevati pozitivna merila (RFI CD86 ≥ 150 in RFI CD54 ≥ 200), viabilnost celic pa mora biti več kot 50-odstotna.

— Pri preskusni kemikaliji mora biti viabilnost celic več kot 50-odstotna pri vsaj štirih preskušenih koncentracijah v vsaki ponovitvi.

30. Negativni rezultati so sprejemljivi samo za preskusne kemikalije, pri katerih je viabilnost celic manj kot 90-odstotna pri najvišji preskušeni koncentraciji (tj. 1,2 × CV75 v skladu z načrtom zaporednega redčenja, opisanim v odstavku 20). Če je viabilnost celic pri 1,2 × CV75 enaka ali večja od 90 %, je treba negativni rezultat zavreči. V takem primeru je priporočljivo, da se poskuša izbira odmerka izpopolniti s ponovitvijo določitve CV75. Opozoriti je treba, da je negativni rezultat sprejemljiv, tudi če je viabilnost celic več kot 90-odstotna, kadar se kot največja preskusna koncentracija preskusne kemikalije uporabi 5 000 μg/ml v fiziološki raztopini (ali gojišču ali drugih topilih/vehiklih), 1 000 μg/ml v DMSO ali najvišja topna koncentracija.

▼M8

Poročilo o preskusu

31. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— fizični videz, vrednost Log Kow, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

— fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

— molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— fizični videz, vrednost Log K_{ow}, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

▼**M8**

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola in kontrola s topilom/vehiklom:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga kontrolna topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni v smernici za preskušanje, in če so na voljo;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Preskusni pogoji:

— ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;

— opis uporabljenega preskusa;

— uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);

— uporabljena pretočna citometrija (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, globulinom, protitelesi in uporabljenim označevalcem citotoksičnosti;

— postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, in postopek, uporabljen za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju, npr. podatki o kontrolah iz preteklih preskusov in/ali podatki iz preteklih preverjanj reaktivnosti.

Merila za sprejemljivost preskusa:

— viabilnost celic, vrednosti MFI in RFI, pridobljene s kontrolo s topilom/vehiklom, v primerjavi z območji sprejemljivosti;

— viabilnost celic in vrednosti RFI, pridobljene s pozitivno kontrolo, v primerjavi z območji sprejemljivosti;

— viabilnost celic vseh preskušenih koncentracij preskušene kemikalije.

▼**M8**

Preskusni postopek:

— uporabljeno število ponovitev;

— uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, nanašanje in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

— preglednice s podatki, ki vključujejo vrednost CV75 (če je ustrezno), posamezne geometrijske vrednosti MFI, RFI, vrednosti viabilnosti celic in vrednosti EC150/EC200 (če je ustrezno), pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo v vsaki ponovitvi, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;

— opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

— razprava o rezultatih, pridobljenih z metodo h-CLAT;

— obravnavanje rezultatov v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767–773.

(2) Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428–437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi, O., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318–1332.

(5) Hirota, M., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Takenouchi, O., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333–1347.

(6) Bauch, C., Kolle, S. N., Ramirez, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2012). Putting the parts together: Combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489–504.

▼**M8**

(7) Van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natch, A., van Loveren, H., Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371–379.

(8) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337–351.

(9) Jaworska, J. S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: A decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355–2383.

(10) Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H., Nishiyama, N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150–60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., Sakaguchi, H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599–609.

(15) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: The human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(16) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683–1969.

(17) Okamoto, K., Kato, Y., Kosaka, N., Mizuno, M., Inaba, H., Sono, S., Ashikaga, T., Nakamura, T., Okamoto, Y., Sakaguchi, H., Kishi, M., Kuwahara, H., Ohno, Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81–88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23 str. Na voljo na: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno, M., Yoshida, M., Kodama, T., Kosaka, N., Okamato, K., Sono, S., Yamada, T., Hasegawa, S., Ashikaga, T., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Sato, J., Ota, N., Okamoto, Y., Ohno, Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70–82.

(20) Sono, S., Mizuno, M., Kosaka, N., Okamoto, K., Kato, Y., Inaba, H., Nakamura, T., Kishi, M., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Okamoto, Y., Ashikaga, T., Ohno, Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7^{th} report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz, Francija, 2005, 96 str.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment (št. 168). Na voljo na: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., Ohno, Y. (2008). Assessment of the Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27–35.

▼M8

Dodatek 1.1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: Stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti.Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (21).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (22).

Kemikalija: snov ali zmes.

CV75: ocenjena koncentracija, pri kateri je viabilnost celic 75-odstotna.

EC150: koncentracije, pri katerih so vrednosti RFI pri izražanju CD86 150.

EC200: koncentracije, pri katerih so vrednosti RFI pri izražanju CD54 200.

Pretočna citometrija: citometrična tehnika, pri kateri celice, suspendirane v tekočini, vsaka posebej potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se razprši v vzorcih, značilnih za celice in njihove komponente;celice se pogosto označijo s fluorescentnimi označevalci, tako da se svetloba najprej absorbira in nato oddaja pri spremenjenih frekvencah.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

Kontrola z gojiščem: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema.Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije.Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

▼M8

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv.Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne bi smela biti previsoka.

Prehapteni: kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo.

Prohapteni: kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo za uresničitev potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože.

Relativna intenziteta fluorescence (RFI): relativne vrednosti geometrijske sredine intenzitete fluorescence (MFI) pri celicah, tretiranih s kemikalijo, v primerjavi z MFI pri celicah, tretiranih s topilom/vehiklom.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek.Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (21).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola.Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (21).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušenih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo.Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (21).

Pufer za barvanje: fosfatni pufer s soljo, ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu.Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo.Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (21).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te metode.

▼M8

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (23).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljaven preskus: preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih.Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (21).

▼M8

Dodatek 1.2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi h-CLAT, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti CV75, EC150 in EC200, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih z metodo h-CLAT. Za metodo h-CLAT so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (3) (14).

Preglednica 1:

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za metodo h-CLAT

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved *in vivo* (1)	CV75 Referenčno območje v µg/ml (2)	Rezultati h-CLAT za CD86 (referenčno območje EC150 v µg/ml) (2)	Rezultati h-CLAT za CD54 (referenčno območje EC200 v µg/ml) (2)
2,4-dinitroklorobenzen	97-00-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močen)	2–12	pozitivna (0,5–10)	pozitivna (0,5–15)
4-fenilendiamin	106-50-3	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	5–95	pozitivna (< 40)	negativna (> 1,5) (3)
nikljev sulfat	10101-97-0	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	30–500	pozitivna (< 100)	pozitivna (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	30–400	negativna (> 10) (3)	pozitivna (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	> 20	negativna (> 5) (3)	pozitivna (< 250)
imidazolidinil urea	39236-46-9	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	25–100	pozitivna (20–90)	pozitivna (20–75)
izopropanol	67-63-0	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	> 5 000	negativna (> 5 000)	negativna (> 5 000)
glicerol	56-81-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	> 5 000	negativna (> 5 000)	negativna (> 5 000)
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	1 500–5 000	negativna (> 5 000)	negativna (> 5 000)
4-aminobenzojska kislina	150-13-0	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	> 1 000	negativna (> 1 000)	negativna (> 1 000)

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

(1) Napoved nevarnosti (in moči) *in vivo* temelji na podatkih za preskus LLNA (3) (14). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (24).

(2) Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (13) (25).

(3) V preteklosti so bili za ta označevalec pridobljeni večinoma negativni rezultati, zato se največkrat pričakuje negativen rezultat. Navedeno območje je bilo opredeljeno na podlagi nekaj ugotovljenih pozitivnih rezultatov v preteklosti. Če je pridobljen pozitiven rezultat, mora biti vrednost EC v navedenem referenčnem območju.

▼M8

Dodatek 2

PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: PRESKUS AKTIVACIJE CELIČNE LINIJE U937 (U-SENS™)

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. S preskusom U-SENS™ se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca, povezanega s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic (DC) (tj. CD86), v celični liniji U937 humanega histiocitnega limfoma po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1). Izmerjene ravni izražanja celičnega površinskega označevalca CD86 v celični liniji U937 se nato uporabijo za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.

2. Preskus U-SENS™ je bil ocenjen v validacijski študiji (2) pod vodstvom družbe L'Oreal in nato z neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki ga je izvedel Znanstveni svetovalni odbor (ESAC) Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) (3). Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov je EURL ECVAM (4) preskus U-SENS™ priporočil za uporabo v okviru IATA za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. OECD v smernicah za poročanje o strukturiranih pristopih k povezovanju podatkov in posameznih virov informacij, ki se uporabljajo v okviru IATA za preobčutljivost kože, obravnava številne študije primerov, ki opisujejo različne strategije preskušanja in napovedne modele. Eden od različnih opredeljenih pristopov temelji na preskusu U-SENS (5). Primeri uporabe podatkov preskusa U-SENS™ v povezavi z drugimi informacijami, vključno s preteklimi podatki in obstoječimi veljavnimi podatki za ljudi (6), so navedeni tudi drugje v virih (4) (5) (7).

3. Izkazalo se je, da se lahko preskus U-SENS™ prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in analizo s pretočno citometrijo. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu, je v enem in več laboratorijih 90- oziroma 84-odstotna (8). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (8) in drugimi objavljenimi študijami (1), na splošno kažejo, da je v primerjavi z rezultati LLNA točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 86-odstotna (N = 166), pri čemer je občutljivost 91-odstotna (118/129) in specifičnost 65-odstotna (24/37). V primerjavi z rezultati za ljudi je točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 77-odstotna (N = 101), pri čemer je občutljivost 100-odstotna (58/58) in specifičnost 47-odstotna (20/43). Lažno negativne napovedi pri preskusu U-SENS™ v primerjavi z LLNA se bodo bolj verjetno nanašale na kemikalije z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot na kemikalije z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (1) (8) (9). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus U-SENS™ uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus U-SENS™ kot samostojni preskus zgolj okvirne, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA in druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.

▼**M8**

4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus U-SENS™ lahko uporablja za preskusne kemikalije (vključno s kozmetičnimi sestavinami, kot so konzervansi, površinsko aktivne snovi, aktivne snovi, barve), ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, fizikalno-kemijske lastnosti, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) in spekter mehanizmov reakcije, za katere je znano, da so povezani s preobčutljivostjo kože (tj. Michaelov akceptor, nastanek Schiffove baze, sredstvo prenosa acilne skupine, bimolekularna nukleofilna substitucija [SN2] ali nukleofilna aromatska substitucija [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Preskus U-SENS™ se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila/vehikla v različne faze) v ustreznem topilu/vehiklu (glej odstavek 13). Kemikalije v podatkovnem nizu, za katere je bilo navedeno, da so prehapteni (tj. snovi, ki se aktivirajo z oksidacijo) ali prohapteni (tj. snovi, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450), so bile s preskusom U-SENS™ pravilno napovedane (1) (10). Snovi, ki povzročajo motnje membrane, lahko privedejo do lažno pozitivnih rezultatov zaradi nespecifičnega povečanja izražanja CD86, saj so bili trije od sedmih lažno pozitivnih rezultatov v zvezi z referenčno klasifikacijo *in vivo* pri površinsko aktivnih snoveh (1). Kot take je treba pozitivne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh obravnavati previdno, medtem ko je negativne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh še vedno mogoče uporabiti za podporo opredelitvi preskusne kemikalije kot snovi, ki ne povzroča preobčutljivosti kože. Fluorescentne preskusne kemikalije se lahko ocenjujejo s preskusom U-SENS™ (1), vendar bodo močne fluorescentne preskusne kemikalije, ki svetlobo oddajajo na isti valovni dolžini kot fluorescein izotiocianat (FITC) ali propidijev jodid (PI), vplivale na zaznavanje s pretočno citometrijo, zato jih ni mogoče pravilno oceniti z uporabo protiteles, konjugiranih s FITC (morebitni lažno negativen rezultat), ali PI (viabilnost ni merljiva). V takem primeru se lahko uporabijo druga s fluorokromom označena protitelesa oziroma drugi označevalci citotoksičnosti, če je mogoče dokazati, da zagotavljajo podobne rezultate, kot s FITC označena protitelesa ali PI (glej odstavek 18), npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Glede na navedeno je treba pozitivne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh in negativne rezultate pri močnih fluorescentnih preskusnih kemikalijah razlagati v okviru navedenih omejitev in skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA. Kadar obstajajo dokazi, da preskusa U-SENS™ ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskus zanje ne bi smel uporabiti.

5. Kot je navedeno zgoraj, preskus U-SENS™ podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože. Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi lahko rezultati preskusa U-SENS™ prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti.

6. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.1.

NAČELO PRESKUSA

7. Preskus U-SENS™ je preskus *in vitro*, s katerim se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca CD86 na celični liniji humanega histiocitnega limfoma, tj. celicah U937, po 45 ± 3-urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Površinski označevalec CD86 je tipični označevalec aktivacije celic U937. Za CD86 je znano, da je kostimulatorna molekula, ki lahko posnema aktivacijo monocitov, ta pa ima ključno vlogo pri označevanju celic T. Spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca CD86 se merijo s pretočno citometrijo po obarvanju celic, običajno s protitelesi, označenimi s fluorescein izotiocianatom (FITC). Sočasno se tudi

▼M8

izmeri citotoksičnost (npr. z uporabo PI), da se oceni, ali se pri subcitotoksičnih koncentracijah pojavi povečano izražanje celičnega površinskega označevalca CD86. Izračuna se stimulacijski indeks (SI) celičnega površinskega označevalca CD86 v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom in uporabi v napovednem modelu (glej odstavek 19), da se podpre razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

8. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da v skladu z dobrimi praksami metode *in vitro* (11) uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.2. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 11) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavka 15 in 16), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

POSTOPEK

9. Ta preskus temelji na protokolu št. 183 storitve za podatkovne zbirke o alternativnih metodah namesto testiranja na živalih (DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)) za preskus U-SENS™ (12). Pri izvajanju in uporabi preskusa U-SENS™ v laboratoriju je treba uporabljati standardne delovne postopke. Uporabi se lahko avtomatiziran sistem za izvajanje preskusa U-SENS™, če je mogoče dokazati, da zagotavlja podobne rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki za preskus U-SENS™.

Priprava celic

10. Za izvedbo preskusa U-SENS™ je treba uporabiti celično linijo humanega histiocitnega limfoma, U937 (13). Celice (klon CRL1593.2) je treba pridobiti iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection.

11. Celice U937 se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO_2 v gojišču RPMI-1 640, dopolnjenem z 10 % telečjega fetalnega seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 enotami/ml penicilina in 100 μg/ml streptomicina (kompletno gojišče). Celice U937 se rutinsko pasažirajo na 2 do 3 dni z gostoto od 1,5 oziroma 3×10^5 celic/ml. Gostota celic ne bi smela presegati 2×10^6 celic/ml, viabilnost celic, izmerjena z izključitvenim testom z barvilom tripan modro, pa mora biti ≥ 90 % (ne sme se uporabiti pri prvi pasaži po odtajanju). Preden se celice uporabijo za preskušanje, je treba vsako serijo celic, FCS ali protiteles kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. Reaktivnost celic je treba preveriti z uporabo pozitivne kontrole, tj. pikrilsulfonske kisline (2,4,6-trinitro-benzen-sulfonska kislina: TNBS) (št. CAS 2 508-19-2, z ≥ 99-odstotno čistostjo), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (št. CAS 50-21-5, z ≥ 85-odstotno čistostjo), najmanj en teden po odtajanju. Za preverjanje reaktivnosti je treba za vsako od dveh kontrol preskusiti šest končnih koncentracij (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml in LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). TNBS, raztopljena v kompletnem gojišču, bi morala povzročiti pozitiven in s koncentracijo povezan odziv CD86 (npr. kadar pozitivni koncentraciji, SI CD86 ≥ 150, sledi koncentracija z naraščajočim SI CD86), LA, raztopljena v kompletnem gojišču, pa bi morala povzročiti negativen odziv CD86 (glej odstavek 21). Za poskus se lahko uporabi samo serija celic, ki so dvakrat uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Celice se lahko namnožujejo do sedem tednov po odtajanju. Število pasaž ne sme presegati 21. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 18 do 22.

▼M8

12. Za preskušanje se celice U937 nasadijo z gostoto bodisi 3×10^5 celic/ml bodisi 6×10^5 celic/ml in predhodno gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur dva dni oziroma en dan. Poleg zgoraj opisanih pogojev predhodnega gojenja se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev in je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan preskusa se celice, odvzete iz stekleničke za gojenje celičnih kultur, znova suspendirajo v svežem gojišču z gostoto 5×10^5 celic/ml. Nato se celice nanesejo na 96-jamično ploščo z ravnim dnom po 100 µl (končna gostota celic je $0{,}5 \times 10^5$ celic/jamico).

Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

13. Pred preskusom se opravi ocena topnosti. V ta namen se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo pri koncentraciji 50 mg/ml v kompletnem gojišču kot prvi možnosti topila ali dimetil sulfoksidu (DMSO, z ≥ 99-odstotno čistostjo) kot drugi možnosti topila/vehikla, če preskusna kemikalija ni topna v topilu/vehiklu kompletnega gojišča. Za preskus se preskusna kemikalija raztopi do končne koncentracije 0,4 mg/ml v kompletnem gojišču, če je kemikalija topna v tem topilu/vehiklu. Če je kemikalija topna samo v DMSO, se raztopi pri koncentraciji 50 mg/ml. Poleg zgoraj opisanih topil/vehiklov se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev. Upoštevati je treba stabilnost preskusne kemikalije v končnem topilu/vehiklu.

14. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Ker se poskus za ugotavljanje odmerka ne izvede, je treba za prvo ponovitev preskusiti šest končnih koncentracij (1, 10, 20, 50, 100 in 200 µg/ml) v ustreznem topilu/vehiklu bodisi v kompletnem gojišču bodisi v 0,4 % DMSO v gojišču. Za nadaljnje ponovitve se z raztopinami preskusne kemikalije, ki se začnejo pri 0,4 mg/ml v kompletnem gojišču ali 50 mg/ml v DMSO, z uporabo ustreznega topila/vehikla pripravijo vsaj štiri delovne raztopine (tj. vsaj štiri koncentracije). Delovne raztopine se nazadnje uporabijo za tretiranje, tako da se količini delovne raztopine na plošči doda enaka količina suspenzije celic U937 (glej odstavek 11 zgoraj), da se doseže nadaljnja dvakratna razredčitev (12). Koncentracije (najmanj štiri) za kakršno koli nadaljnjo ponovitev se izberejo na podlagi posameznih rezultatov vseh prejšnjih ponovitev (8). Uporabne končne koncentracije so 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 in 200 µg/ml. Najvišja končna koncentracija je 200 µg/ml. Če je pozitivna vrednost CD86 ugotovljena pri 1 µg/ml, potem se oceni 0,1 µg/ml, da se poišče koncentracija preskusne kemikalije, ki ne sproži CD86 nad pozitivnim pragom. Za vsako ponovitev se izračuna EC150 (koncentracija, pri kateri kemikalija doseže pozitivni prag CD86 v višini 150 %, glej odstavek 19), če je ugotovljen pozitivni odziv CD86, povezan s koncentracijo. Kadar preskusna kemikalija povzroči pozitivni odziv CD86, ki ni povezan s koncentracijo, izračun EC150 morda ne bo relevanten, kot je opisano v protokolu U-SENS™ DB-ALM št. 183 (12). Kadar je to mogoče, se za vsako ponovitev izračuna CV70 (koncentracija, pri kateri kemikalija doseže 70-odstotni prag citotoksičnosti, glej odstavek 19) (12). Za preiskavo učinka odziva na koncentracijo za povečanje CD86 je treba vse koncentracije iz uporabnih koncentracij izbrati tako, da so enakomerno razporejene med EC150 (ali najvišjo necitotoksično koncentracijo, pri kateri je CD86 negativen) in CV70 (ali najvišjo dopustno koncentracijo, tj. 200 µg/ml). Za primerjavo je treba preskusiti najmanj štiri koncentracije na ponovitev, pri čemer morata biti vsaj dve koncentraciji enaki kot pri predhodnih ponovitvah.

▼M8

15. Kontrola s topilom/vehiklom, uporabljena pri preskusu U-SENS™, je kompletno gojišče (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v kompletnem gojišču) (glej odstavek 4) ali 0,4 % DMSO v kompletnem gojišču (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v DMSO).

16. Pozitivna kontrola, uporabljena pri preskusu U-SENS™, je TNBS (glej odstavek 11), pripravljena v kompletnem gojišču. TNBS je treba kot pozitivno kontrolo za meritev izražanja CD86 uporabiti pri enotni končni koncentraciji na plošči (50 μg/ml), pri kateri je viabilnost celic več kot 70-odstotna. Za 50 μg/ml koncentracije TNBS na plošči se pripravi 1 M (tj. 293 mg/ml) osnovna raztopina TNBS v kompletnem gojišču in nadalje 2 930-krat razredči s kompletnim gojiščem v 100 μg/ml delovno raztopino. Mlečno kislino (LA, CAS 50-21-5) je treba uporabiti kot negativno kontrolo pri 200 μg/ml, raztopljenih v kompletnem gojišču (iz 0,4 mg/ml osnovne raztopine). Na vsaki plošči vsake ponovitve se pripravijo trije ponovljeni vzorci netretirane kontrole s kompletnim gojiščem, kontrole s topilom/vehiklom ter negativne in pozitivne kontrole (12). Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Merila za sprejemljivost ponovitev so enaka kot merila, opisana za preskusno kemikalijo (glej odstavek 12).

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

17. Kontrola s topilom/vehiklom ali delovne raztopine, opisane v odstavkih od 14 do 16, se zmešajo v razmerju 1: 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 12). Obdelane plošče se nato inkubirajo 45 ± 3 ure pri 37 °C v prisotnosti 5 % CO_2. Pred inkubacijo se plošče zatesnijo s polprepustno membrano, da se prepreči izhlapevanje hlapnih preskusnih kemikalij in navzkrižna kontaminacija med celicami, tretiranimi s preskusnimi kemikalijami (12).

Barvanje celic

18. Po 45 ± 3-urni izpostavljenosti se celice prenesejo na mikrotitrsko ploščo z jamicami v obliki črke V in zberejo s centrifugiranjem. Interferenca topnosti je opredeljena kot kristali ali kapljice, opažene pod mikroskopom 45 ± 3 ure po tretiranju (pred barvanjem celic). Supernatanti se zavržejo, preostale celice pa se enkrat sperejo s 100 μl ledeno mrzlega fosfatnega pufra s soljo (PBS), ki vsebuje 5 % telečjega fetalnega seruma (pufer za barvanje). Po centrifugiranju se celice znova suspendirajo s 100 μl pufra za barvanje in 30 minut barvajo s 5 μl (npr. 0,25 μg) s FITC označenih protiteles anti-CD86 ali mišjih protiteles (izotipa) IgG1 pri 4 °C, pri čemer so zaščitene pred svetlobo. Uporabiti je treba protitelesa, opisana v protokolu U-SENS™ DB-ALM št. 183 (12) (za CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, ali Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; in za IgG1: BD-PharMingen #5557 48 ali Caltag/Invitrogen # GM4992). Na podlagi izkušenj razvijalcev preskusov je intenziteta fluorescence protiteles med različnimi serijami običajno konsistentna. Za poskus se lahko uporabijo tudi drugi kloni ali dobavitelji protiteles, ki so uspešno prestali preverjanje reaktivnosti (glej odstavek 11). Vendar lahko uporabniki razmislijo o titraciji protiteles v pogojih lastnega laboratorija, da se opredeli najboljša koncentracija za uporabo. Uporabijo se lahko tudi drugi sistemi zaznavanja, npr. s fluorokromom označena protitelesa anti-CD86, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC konjugirana protitelesa, na primer s

▼M8

preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Po dvakratnem spiranju s 100 µl pufra za barvanje in enkratnem spiranju s 100 µl ledeno mrzlega PBS se celice znova suspendirajo v ledeno mrzlem PBS (npr. 125 µl za vzorce, ki se analizirajo ročno po posameznih epruvetah, ali 50 µl, če se uporablja avtomatski vzorčevalnik) in doda se raztopina PI (končna koncentracija 3 µg/ml). Uporabijo se lahko drugi označevalci citotoksičnosti, kot je 7-aminoactinomicin D (7-AAD) ali tripan modro, če je mogoče dokazati, da alternativna barvila dajejo podobne rezultate kot PI, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2.

Analiza s pretočno citometrijo

19. Raven izražanja CD86 in viabilnost celic se analizirata s pretočno citometrijo. Celice se prikažejo v točkovnem diagramu velikosti (FSC) in granuliranosti (SSC) na logaritemski skali, da se jasno opredeli populacija pri prvih vratih R1 in izločijo drobci. Za vsako jamico pri vratih R1 je cilj pridobiti 10 000 celic. Celice pri istih vratih R1 so prikazane v točkovnem diagramu FL3 ali FL4/SSC. Viabilne celice se prikažejo s postavitvijo drugih vrat R2, s čimer se izbere populacija celic, ki ne reagirajo na propidijev jodid (kanal FL3 ali FL4). Viabilnost celic se lahko izračuna z naslednjo enačbo v citometrijskem analiznem programu. Kadar je viabilnost celic majhna, se lahko pridobi do 20 000 celic, vključno z mrtvimi celicami. Alternativno se lahko podatki zajemajo eno minuto po začetku analize.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Delež FL1-pozitivnih celic se nato izmeri med temi viabilnimi celicami pri vratih R2 (znotraj R1). Izražanje CD86 na površini celic se analizira v točkovnem diagramu FL1/SSC v okviru vrat za viabilne celice (R2).

Za jamice s kompletnim gojiščem/IgG1 se analizni označevalec nastavi blizu glavni populaciji, tako da imajo kontrole s kompletnim gojiščem IgG1 v ciljnem območju od 0,6 do 0,9 %.

Barvna interferenca je opredeljena kot sprememba točkovnega diagrama s FITC označenih IgG1 (geo. sr. SI FL1 IgG1 ≥ 150 %).

Stimulacijski indeks (SI) CD86 za kontrolne celice (netretirane ali v 0,4 % DMSO) in celice, tretirane s kemikalijo, se izračuna v skladu z naslednjo enačbo:.

$$S.I. = \frac{\%\ of\ CD86^{+} treated\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} treated\ cells}{\%\ of\ CD86^{+} control\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} control\ cells} \times 100$$

% netretiranih kontrolnih celic $IgG1^{+}$: delež FL1-pozitivnih celic IgG1, opredeljenih z analiznim označevalcem (sprejemljiv razpon ≥ 0,6 % in < 1,5 %, glej odstavek 22), med viabilnimi netretiranimi celicami.

% kontrolnih/tretiranih celic $IgG1^{+}/CD86^{+}$: delež FL1-pozitivnih celic IgG1/CD86, izmerjen brez premikanja analiznega označevalca med viabilnimi kontrolnimi/tretiranimi celicami.

▼**M8**

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

20. Pri preskusu U-SENS™ se izračunata naslednja parametra: vrednost CV70, tj. koncentracija, pri kateri se pokaže 70-odstotno preživetje celic U937 (30-odstotna citotoksičnost), in vrednost EC150, tj. koncentracija, pri kateri so preskusne kemikalije povzročile stimulacijski indeks (SI) CD86 150 %.

CV70 se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

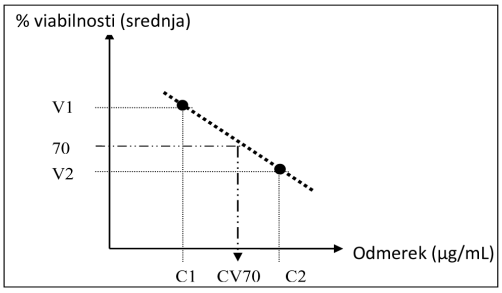
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

pri čemer je:

V1 najnižja vrednost viabilnosti celic nad 70 %,

V2 najvišja vrednost viabilnosti celic pod 70 %,

C1 in C2 sta koncentraciji, pri katerih se pokaže vrednost viabilnosti celic V1 oziroma V2.



Za pridobitev CV70 se lahko uporabijo tudi drugi pristopi, če se dokaže, da to ne vpliva na rezultate (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti).

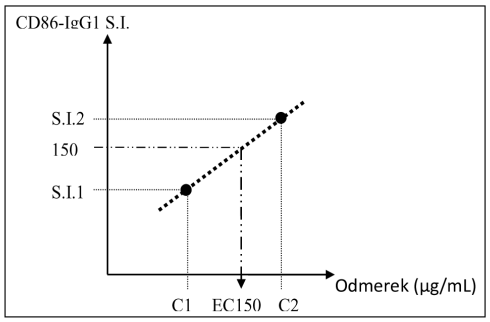
EC150 se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI\ 1) / (SI\ 2 - SI\ 1) * (C2 - C1)]$$

pri čemer je:

C1 najvišja koncentracija v µg/ml s SI CD86 > 150 % (SI 1),

C2 najnižja koncentracija v µg/ml s SI CD86 ≥ 150 % (SI 2).



▼**M8**

Vrednosti EC150 in CV70 se izračunata

— za vsako ponovitev: posamezne vrednosti EC150 in CV70 se uporabijo kot orodja za preiskavo učinka odziva na koncentracijo za povečanje CD86 (glej odstavek 14);

— na podlagi povprečnih viabilnosti se določi skupna CV70 (12);

— na podlagi povprečnih vrednosti SI CD86 se določi skupna EC150 za preskusno kemikalijo, ki je s preskusom U-SENS™ napovedana kot POZITVNA (glej odstavek 21) (12).

Napovedni model

21. Za meritev izražanja CD86 se vsaka preskusna kemikalija preskusi v najmanj štirih koncentracijah in najmanj dveh neodvisnih ponovitvah (opravljenih na drug dan), iz katerih se izpelje ena sama napoved (NEGATIVNA ali POZITIVNA).

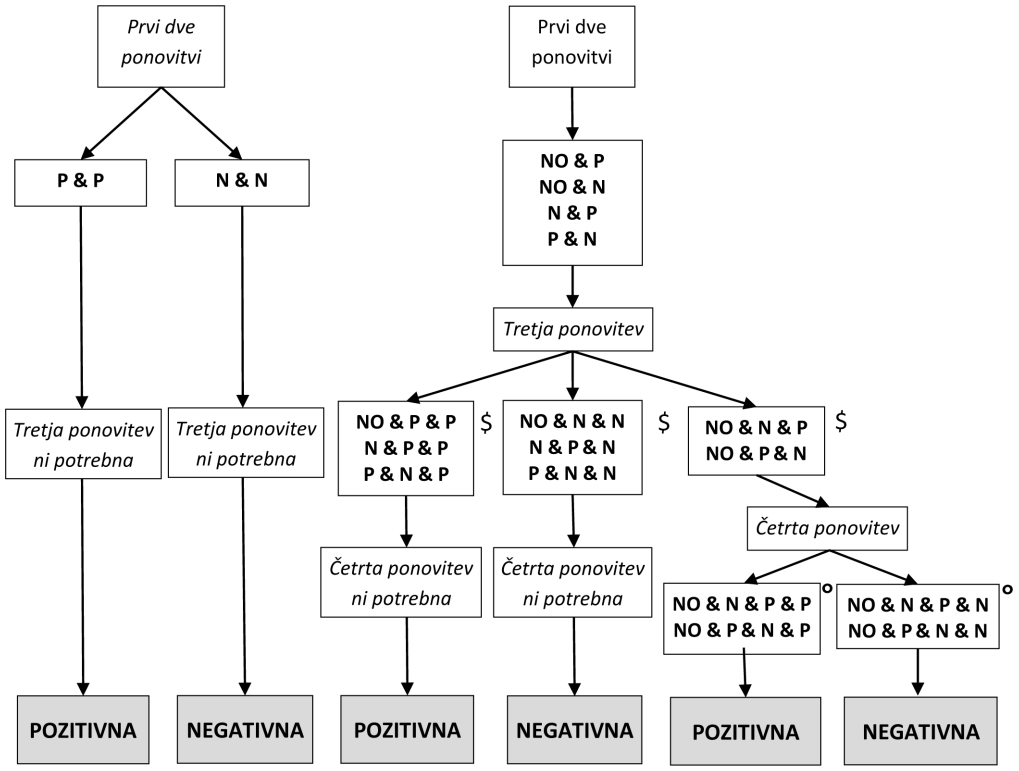
— Posamezna sklepna ugotovitev ponovitve v preskusu U-SENS™ se obravnava kot negativna (v nadaljnjem besedilu: N), če je SI CD86 manjši od 150 % pri vseh necitotoksičnih koncentracijah (viabilnost celic $\geq$ 70 %) in če ni ugotovljena nobena interferenca (citotoksičnost, topnost: glej odstavek 18; ali barva: glej odstavek 19 ne glede na to, pri katerih necitotoksičnih koncentracijah je interferenca zaznana). V vseh drugih primerih: če je SI CD86 večji od ali enak 150 % in/ali so ugotovljene interference, se posamezna sklepna ugotovitev ponovitve v preskusu U-SENS™ obravnava kot pozitivna (v nadaljnjem besedilu: P).

— Napoved U-SENS™ se obravnava kot NEGATIVNA, če sta vsaj dve neodvisni ponovitvi negativni (N) (slika 1). Če sta obe prvi ponovitvi negativni (N), se napoved U-SENS™ obravnava kot NEGATIVNA, tretje ponovitve pa ni treba izvesti.

— Napoved U-SENS™ se obravnava kot POZITIVNA, če sta vsaj dve neodvisni ponovitvi pozitivni (P) (slika 1). Če sta obe prvi ponovitvi pozitivni (P), se napoved U-SENS™ obravnava kot POZITIVNA, tretje ponovitve pa ni treba izvesti.

— Ker se poskus za ugotavljanje odmerka ne izvede, obstaja izjema, če je v prvi ponovitvi SI CD86 večji od 150 % ali enak 150 % samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji. Za ponovitev se nato šteje, da je NEOPREDELJIVA (NO), tako da je treba preskusiti dodatne koncentracije (med najvišjo necitotoksično koncentracijo in najnižjo citotoksično koncentracijo – glej odstavek 20) v dodatnih ponovitvah. Če je ponovitev opredeljena kot NO, je treba izvesti najmanj dve dodatni ponovitvi in še četrto ponovitev, če druga in tretja ponovitev nista skladni (N in/ali P neodvisno) (slika 1). Nadaljnje ponovitve bodo obravnavane kot pozitivne, tudi če je CD86 enak ali večji od 150 % samo pri eni necitotoksični koncentraciji, ker je bila koncentracija prilagojena specifični preskusni kemikaliji. Končna napoved bo temeljila na večinskem rezultatu treh ali štirih posameznih ponovitev (tj. dveh od treh ali dveh od štirih) (slika 1).

▼**M8**



Slika 1: Napovedni model, uporabljen pri preskusu U-SENS™. Napoved U-SENS™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavka 4 ter odstavkov 7, 8 in 9 iz Splošnega uvoda.

N: ponovitev, pri kateri CD86 ni pozitiven ali interferenca ni ugotovljena;

P: ponovitev, pri kateri je CD86 pozitiven in/ali so interference ugotovljene;

NO: neopredeljiva. Prva ponovitev brez dokončne ugotovitve, kadar je CD86 pozitiven samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji;

#: Posamezna neopredeljiva (NO) sklepna ugotovitev, pripisana samo prvi ponovitvi, samodejno vodi do tega, da je treba izvesti tretjo ponovitev, da se doseže večina pozitivnih (P) ali negativnih (N) sklepnih ugotovitev v vsaj dveh od treh neodvisnih ponovitev.

$: Okenca prikazujejo ustrezne kombinacije rezultatov iz treh ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih dveh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu.

°: Okenca prikazujejo ustrezne kombinacije rezultatov iz štirih ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih treh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu.

Merila za sprejemljivost

22. Pri uporabi preskusa U-SENS™ morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost (12).

— Po koncu 45 ± 3-urne izpostavljenosti mora biti srednja viabilnost tripleta netretiranih celic U937 > 90 %, v izražanju CD86 pa ni ugotovljen noben odmik. Bazalno izražanje CD86 pri netretiranih celicah U937 mora biti v območju ≥ 2 % in ≤ 25 %.

▼M8

— Kadar se kot topilo uporabi DMSO, se veljavnost kontrole z vehiklom DMSO oceni z izračunom SI DMSO v primerjavi z netretiranimi celicami, srednja viabilnost tripleta celic pa je morala biti > 90 %. Kontrola z vehiklom DMSO je veljavna, če je bila srednja vrednost SI CD86 njenega tripleta nižja od 250 % srednjega SI CD86 tripleta netretiranih celic U937.

— Ponovitve se štejejo za veljavne, če sta bili vsaj dve od treh vrednosti IgG1 netretiranih celic U937 v območju ≥ 0,6 % in < 1,5 %.

— Sočasno preskušena negativna kontrola (mlečna kislina) se šteje za veljavno, če sta bila vsaj dva od treh ponovljenih vzorcev negativna (SI CD86 < 150 %) in necitotoksična (viabilnost celic ≥ 70 %).

— Pozitivna kontrola (TNBS) se šteje za veljavno, če sta bila vsaj dva od treh ponovljenih vzorcev pozitivna (SI CD86 ≥ 150 %) in necitotoksična (viabilnost celic ≥ 70 %).

Poročilo o preskusu

23. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— fizični videz, topnost v kompletnem gojišču, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

— fizični videz, topnost v kompletnem gojišču, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

— molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

▼**M8**

Kontrole

Pozitivna kontrola:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— fizični videz, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola in kontrola s topilom/vehiklom:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga kontrolna topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni v smernici za preskušanje, in če so na voljo;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Preskusni pogoji:

— ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;

— opis uporabljenega preskusa;

— uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);

— uporabljena pretočna citometrija (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, protitelesi in uporabljenim označevalcem citotoksičnosti;

— postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, in postopek, uporabljen za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju, npr. podatki o kontrolah iz preteklih preskusov in/ali podatki iz preteklih preverjanj reaktivnosti.

Merila za sprejemljivost preskusa:

— viabilnost celic in vrednosti SI CD86, pridobljene s kontrolo s topilom/vehiklom, v primerjavi z območji sprejemljivosti;

▼M8

— viabilnost celic in vrednosti SI, pridobljene s pozitivno kontrolo, v primerjavi z območji sprejemljivosti;

— viabilnost celic vseh preskušenih koncentracij preskušene kemikalije.

Preskusni postopek:

— uporabljeno število ponovitev;

— uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, nanašanje in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);

— trajanje izpostavljenosti;

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

— preglednice s podatki, ki vključujejo vrednost CV70 (če je ustrezno), vrednosti viabilnosti celic in vrednosti EC150 (če je ustrezno), pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo v vsaki ponovitvi, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;

— opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

— razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom U-SENS™;

— obravnavanje rezultatov v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

Sklepne ugotovitve

VIRI

(1) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Na voljo na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Na voljo na: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Na voljo na: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment (št. 256), ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*71, 337–351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373–382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.*87, 1 683–1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33 str. Na voljo na: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Združeni narodi (ZN) (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, šesta revidirana izdaja, New York in Ženeva: United Nations Publications. Na voljo na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment (št. 168): The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruselj. Na voljo na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Dodatek 2.1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti.Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (14).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (15).

Koncentracijski odziv CD86: obstaja odvisnost od koncentracije (ali odziv na koncentracijo), kadar pozitivni koncentraciji (SI CD86 ≥ 150) sledi koncentracija z naraščajočim SI CD86).

Kemikalija: snov ali zmes.

CV70: ocenjena koncentracija, pri kateri je viabilnost celic 70-odstotna.

Odmik: odmik je opredeljen tako (i) popravljena vrednost $\%CD86^{+}$ netretiranega kontrolnega ponovljenega vzorca 3 je nižja od 50 % srednje vrednosti popravljene vrednosti $\%CD86^{+}$ netretiranih kontrolnih ponovljenih vzorcev 1 in 2;ter (ii) popravljena vrednost $\%CD86^{+}$ negativnega kontrolnega ponovljenega vzorca 3 je nižja od 50 % srednje vrednosti popravljene vrednosti $\%CD86^{+}$ negativnih kontrolnih ponovljenih vzorcev 1 in 2.

EC150: ocenjene koncentracije, pri katerih je SI izražanja CD86 150 %.

Pretočna citometrija: citometrična tehnika, pri kateri celice, suspendirane v tekočini, vsaka posebej potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se razprši v vzorcih, značilnih za celice in njihove komponente;celice se pogosto označijo s fluorescentnimi označevalci, tako da se svetloba najprej absorbira in nato oddaja pri spremenjenih frekvencah.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije.Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

▼M8

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv.Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti previsoka.

Prehapteni: kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo, npr. oksidacijo.

Prohapteni: kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, da bi uresničevale potencial za povzročanje preobčutljivosti kože.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek.Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (14).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola.Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (14).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušenih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo.Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (14).

SI: stimulacijski indeks.Relativne vrednosti geometrijske srednje vrednosti intenzitete fluorescence pri celicah, tretiranih s kemikalijo, v primerjavi s celicami, tretiranimi s topilom.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu.Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo.Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (14).

Pufer za barvanje: fosfatni pufer s soljo, ki vsebuje 5 % telečjega fetalnega seruma.

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo tega preskusa.

▼M8

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (16).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljaven preskus: preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih.Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (14).

▼M8

Dodatek 2.2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi U-SENS™, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti CV70 in EC150, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusom U-SENS™. Za preskus U-SENS™ so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (1) (8).

Preglednica 1

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskus U-SENS™

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved *in vivo* [1]	U-SENS Topilo/vehikel	U-SENS CV70 Referenčno območje v µg/ml [2]	U-SENS EC150 Referenčno območje v µg/ml [2]
4-fenilendiamin	106-50-3	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	kompletno gojišče [3]	< 30	pozitivna (≤ 10)
pikrilsulfonska kislina	2508-19-2	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	kompletno gojišče	> 50	pozitivna (≤ 50)
dietil maleat	141-05-9	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	DMSO	10–100	pozitivna (≤ 20)
rezorcinol	108-46-3	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	kompletno gojišče	> 100	pozitivna (≤ 50)
cimetov alkohol	104-54-1	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	DMSO	> 100	pozitivna (10–100)
4-alilanizol	140-67-0	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	DMSO	> 100	pozitivna (< 200)
saharin	81-07-2	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	DMSO	> 200	negativna (> 200)
glicerol	56-81-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	kompletno gojišče	> 200	negativna (> 200)
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	kompletno gojišče	> 200	negativna (> 200)
salicilna kislina	69-72-7	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	DMSO	> 200	negativna (> 200)

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

([1]) Napoved nevarnosti (in moči) *in vivo* temelji na podatkih za preskus LLNA (1) (8). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (17).

([2]) Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (1) (8).

([3]) Kompletno gojišče:gojišče RPMI-1640, dopolnjeno z 10 % telečjega fetalnega seruma, 2 mM L-glutamina, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina (8).

▼**M8**

Dodatek 3

PREOBČUTLJIVOST KOŽE *IN VITRO*: PRESKUS IL-8 LUC

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. V nasprotju s preskusi, s katerimi se analizira izražanje celičnih površinskih označevalcev, se s preskusom IL-8-Luc kvantificirajo spremembe v izražanju IL-8, tj. citokina, povezanega z aktivacijo dendritskih celic (DC). V reporterski celični liniji IL-8, pridobljeni iz celic THP-1 (THP-G8, pridobljen iz celične linije humane akutne monocitne levkemije THP-1), se izražanje IL-8 meri po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1). Izražanje luciferaze se nato uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.

2. Preskus IL-8 Luc je bil ocenjen v validacijski študiji (2), ki so jo izvedli Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM), **ministrstvo za gospodarstvo, trgovino in industrijo** (MGTO) in Japanese Society **for Alternatives to Animal Experiments (japonska družba za alternative poskusom na živalih) (JSAAE**), nato pa še z neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom (3) pod vodstvom JaCVAM ter ministrstva za zdravje, delo in blaginjo (MZDB) ob podpori **International Cooperation on Alternative Test** Methods (mednarodno sodelovanje pri alternativnih preskusnih metodah) (ICATM). Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov se preskus IL-8 Luc šteje za koristen v okviru IATA za razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. Primeri uporabe podatkov preskusa IL-8 Luc v povezavi z drugimi informacijami so navedeni v virih (4) (5) (6).

3. Izkazalo se je, da se lahko preskus IL-8 Luc prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in meritvami luciferaze. Obnovljivost v enem in več laboratorijih je bila 87,7-odstotna oziroma 87,5-odstotna (2). Podatki, pridobljeni z validacijsko študijo (2), in druga objavljena dela (1) (6) kažejo, da je bilo v primerjavi z LLNA s preskusom IL-8 Luc 118 od 143 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 25 pa kot neopredeljivih, točnost preskusa IL-8 Luc pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, pa je 86-odstotna (101/118), pri čemer je občutljivost 96-odstotna (92/96) in specifičnost 41-odstotna (9/22). Z izključitvijo snovi, ki ne spadajo na spodaj opisano področje uporabe (odstavek 5), je bilo s preskusom IL-8 Luc 113 od 136 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 23 pa kot neopredeljivih, točnost preskusa IL-8 Luc pa je 89-odstotna (101/113), pri čemer je občutljivost 96-odstotna (92/96) in specifičnost 53-odstotna (9/17). Z uporabo podatkov za ljudi, navedenih v Urbisch *et al*. (7), je bilo s preskusom IL-8 Luc 76 od 90 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 14 pa kot neopredeljivih, točnost pa je 80-odstotna (61/76), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (54/58) in specifičnost 39-odstotna (7/18). Z izključitvijo snovi, ki ne spadajo na področje uporabe, je bilo s preskusom IL-8 Luc 71 od 84 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 13 pa kot neopredeljivih, točnost pa je 86-odstotna (61/71), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (54/58) in specifičnost 54-odstotna (7/13). Lažno negativne napovedi pri preskusu IL-8 Luc se bodo bolj verjetno pojavile pri kemikalijah z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pri kemikalijah z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (6). Vse te informacije skupaj podpirajo vlogo

▼M8

preskusa IL-8 Luc pri opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Točnost, navedena za preskus IL-8 Luc kot samostojen preskus, je zgolj okvirna, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju preskusov za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.

4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus IL-8 Luc lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (2) (6).

5. Čeprav se pri preskusu IL-8 Luc kot topilo uporablja X-VIVO™ 15, so bile z njim pravilno ocenjene kemikalije z vrednostjo Log K_{ow} > 3,5 in kemikalije s topnostjo v vodi približno 100 μg/ml, kot je bila izračunana z EPI Suite™, njegova uspešnost zaznavanja povzročiteljev preobčutljivosti s slabo topnostjo v vodi pa je boljša kot pri preskusu IL-8 Luc, pri katerem se kot topilo uporabi dimetil sulfoksid (DMSO) (2). Vendar pa lahko negativni rezultati za preskusne kemikalije, ki niso topne pri 20 mg/ml, povzročijo lažno negativne rezultate, ker niso topne v X-VIVO™ 15. Zato se negativni rezultati za te kemikalije ne smejo upoštevati. V validacijski študiji je bila ugotovljena visoka lažno negativna stopnja za anhidride. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti celične linije (8) in poskusnih pogojev pri prohaptenih (tj. snoveh, ki potrebujejo presnovno aktivacijo) in prehaptenih (tj. snoveh, aktiviranih z oksidacijo z zrakom) v preskusu pojavijo negativni rezultati. Čeprav je treba negativne rezultate za domnevne pre/prohaptene razlagati previdno, pa je bilo s preskusom IL-8 Luc pravilno ocenjenih 11 od 11 prehaptenov, 6/6 prohaptenov ter 6/8 pre/prohaptenov v podatkovnem nizu preskusa IL-8 Luc (2). Na podlagi nedavnega obsežnega pregleda treh preskusov, ki se ne izvajajo na živalih (DPRA, KeratinoSens™ in h-CLAT), za odkrivanje prehaptenov in prohaptenov (9) ter na podlagi dejstva, da so celice THP-G8, uporabljene v preskusu IL-8 Luc, celična linija, pridobljena iz celic THP-1, ki se uporabljajo v preskusu h-CLAT, lahko preskus IL-8 Luc tudi prispeva k povečanju občutljivosti preskusov, ki se ne izvajajo na živalih, za odkrivanje prehaptenov in prohaptenov v povezavi z drugimi preskusi. Do zdaj preskušene površinsko aktivne snovi so dale (lažno) pozitivne rezultate ne glede na svojo vrsto (npr. kationske, anionske ali neionske). Nazadnje, kemikalije, ki motijo luciferazo, lahko motijo njeno aktivnost/meritev in povzročajo očitno zaviranje ali povečano luminiscenco (10). Poročalo se je na primer o tem, da koncentracije fitoestrogena, višje od 1 μM, motijo luminiscenčne signale v drugih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena. Zato je treba izražanje luciferaze, pridobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti (11). Glede na navedeno so površinsko aktivne snovi, anhidridi in kemikalije, ki motijo luciferazo, izključene s področja uporabe tega preskusa. Kadar obstajajo dokazi, da preskusa IL-8 Luc ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskus zanje ne sme uporabiti.

6. Kot je navedeno zgoraj, preskus IL-8 Luc podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Potrebno je nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da bi se določilo, kako bi lahko rezultati preskusa IL-8 Luc prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti, kadar se obravnavajo v povezavi z drugimi viri informacij.

▼M8

7. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 3.1.

NAČELO PRESKUSA

8. Pri preskusu IL-8 Luc se uporabi celična linija humane monocitne levkemije, tj. THP-1, ki je bila pridobljena iz celične banke American Type Culture Collection (Manassas, Virginija, ZDA). Z uporabo te celične linije je oddelek za dermatologijo na fakulteti za medicino v Tohokuju izdelal THP-G8 reportersko celično linijo IL-8 na podlagi THP-1, ki vključuje luciferazna gena za SLO (stable luciferase orange) in SLR (stable luciferase red) pod kontrolo promotorjev IL-8 oziroma gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) (1). To omogoča kvantitativno merjenje indukcije luciferaznega gena z zaznavanjem luminiscence, pri čemer se kot kazalnik aktivnosti IL-8 in GAPDH v celicah po izpostavljenosti kemikalijam, ki povzročajo preobčutljivost, uporabijo dobro vzpostavljeni luciferazni substrati, ki oddajajo svetlobo.

9. Sistem preskusa z dvema barvama vključuje luciferazo, ki oddaja oranžno svetlobo (SLO; λmaks. = 580 nm) (12), za izražanje gena promotorja IL-8 in luciferazo, ki oddaja rdečo svetlobo (SLR; λmaks. = 630 nm) (13), za izražanje gena notranjega kontrolnega promotorja GAPDH. Luciferazi oddajata različno barvo po reakciji z d-luciferinom kresničke, njuna luminiscenca pa se izmeri sočasno v enostopenjski reakciji z delitvijo oddajanja iz zmesi za preskus z uporabo optičnega filtra (14) (Dodatek 3.2).

10. Celice THP-G8 se 16 ur tretirajo s preskusno kemikalijo, nakar se izmerita aktivnost luciferaze SLO (SLO-LA), ki izraža aktivnost promotorja IL-8, in aktivnost luciferaze SLR (SLR-LA), ki izraža aktivnost promotorja GAPDH. Zaradi lažjega razumevanja kratic sta SLO-LA in SLR-LA označeni kot IL8LA oziroma GAPLA. Preglednica 1 vsebuje opis izrazov, povezanih z aktivnostjo luciferaze v preskusu IL-8 Luc. Izmerjene vrednosti se uporabijo za izračun normalizirane IL8LA (nIL8LA), ki je razmerje med IL8LA in GAPLA; indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), ki je razmerje med aritmetičnimi sredinami štirikratnika izmerjenih vrednosti nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s preskusno kemikalijo, in vrednostmi nIL8LA netretiranih celic THP-G8; in inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), ki je razmerje med aritmetičnimi sredinami štirikratnika izmerjenih vrednosti GAPLA celic THP-G8, tretiranih s preskusno kemikalijo, in vrednostmi GAPLA netretiranih celic THP-G8, ter uporabijo kot kazalnik za citotoksičnost.

Preglednica 1

Opis izrazov, povezanih z aktivnostjo luciferaze v preskusu IL-8 Luc

Kratice	Opredelitev
GAPLA	Aktivnost luciferaze SLR, ki izraža aktivnost promotorja GAPDH
IL8LA	Aktivnost luciferaze SLO, ki izraža aktivnost promotorja IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami/nIL8LA netretiranih celic

▼**M8**

Kratice	Opredelitev
Inh-GAPLA	GAPLA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami/GAPLA netretiranih celic
CV05	Najnižja koncentracija kemikalije, pri kateri Inh-GAPLA postane < 0,05

11. Na voljo so standardi izvajanja (15), da se olajša validacija prilagojenih luciferaznih preskusov z IL-8 *in vitro*, ki so podobni preskusu IL-8 Luc, in omogoči pravočasna sprememba Smernice OECD za preskušanje 442E za njihovo vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno le za preskuse, validirane v skladu s standardi izvajanja, če je te preskuse pregledala OECD in jih vključila v Smernico za preskušanje 442E (16).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

12. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da v skladu z dobrimi praksami metode *in vitro* (17) uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 3.3. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 15) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavke od 21 do 24), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

POSTOPEK

13. Na voljo je standardni delovni postopek za preskus IL-8 Luc, ki ga je treba uporabiti pri izvajanju preskusa (18). Laboratoriji, ki želijo izvesti preskus, lahko rekombinantno celično linijo THP-G8 pridobijo od družbe GPC Lab. VCo. Ltd., Tottori, Japonska, če podpišejo sporazum o prenosu materiala v skladu s pogoji iz predloge OECD. naslednjih odstavkih so opisani glavne sestavine in postopki preskusa.

Priprava celic

14. Za izvedbo preskusa IL-8 Luc je treba uporabiti celično linijo THP-G8 družbe GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska (glej odstavka 8 in 13). Celice se po prejemu namnožijo (od 2 do 4 pasaže) in shranijo zamrznjene kot homogena zaloga. Celice iz te zaloge se lahko namnožujejo do največ 12 pasaž ali največ 6 tednov. Gojišče, ki se uporablja za namnoževanje, je gojišče RPMI-1640, ki vsebuje 10 % fetusnega seruma goveda (FBS), antibiotično/antimikotično raztopino (100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina in 0,25 µg/ml amfotericina B in 0,85 % fiziološke raztopine) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicina (npr. CAS:58-58-2) in 300 µg/ml G418 (npr. CAS:108321-42-2).

15. Preden se celice uporabijo za preskus, jih je treba kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. To preverjanje je treba opraviti od 1 do 2 tedna ali od 2 do 4 pasaže po odtajanju z uporabo pozitivne kontrole, tj. 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99-odstotna čistost), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (CAS:50-21-5, ≥ 85-odstotna čistost). 4-NBB bi moral povzročiti pozitiven odziv na Ind-IL8LA (≥ 1,4), medtem ko bi morala LA povzročiti negativen odziv na Ind-IL8LA (< 1,4). Za preskus se uporabijo samo celice, ki so uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 22 do 24.

▼M8

16. Za preskušanje se celice THP-G8 nasadijo z gostoto od 2 do 5×10^5 celic/ml in predhodno gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur od 48 do 96 ur. Na dan preskusa se celice odvzamejo iz stekleničke za gojenje celičnih kultur in sperejo z RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS brez kakršnih koli antibiotikov, nato pa se ponovno suspendirajo v RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS brez kakršnih koli antibiotikov, z gostoto 1×10^6 celic/ml. Celice se nato nanesejo na črno 96-jamično ploščo z ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) po 50 µl (5×10^4 celic/jamico).

Priprava preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

17. Preskusna kemikalija in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za preskus IL-8 Luc se preskusne kemikalije raztopijo v X-VIVO™ 15, tj. gojišču brez seruma, ki je na voljo na trgu (Lonza, 04-418Q), do končne koncentracije 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se doda 20 mg preskusne kemikalije (ne glede na topnost kemikalije) v mikrocentrifugirki do količine 1 ml ter nato 30 minut energično meša in stresa na rotorju pri največji hitrosti 8 vrt/min pri sobni temperaturi približno 20 °C. Če se trdne kemikalije še vedno ne raztopijo, se epruveta ultrazvočno obdela, dokler ni kemikalija popolnoma raztopljena ali stabilno dispergirana. Pri preskusnih kemikalijah, ki so topne v X-VIVO™ 15, se raztopina razredči s faktorjem 5 z X-VIVO™ 15 in uporabi kot osnovna raztopina preskusne kemikalije z X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v X-VIVO™ 15, se zmes znova rotira najmanj 30 minut in nato 5 min centrifugira pri 15000 vrt/min (≈ 20 000*g*); nastali supernatant se uporabi kot osnovna raztopina preskusne kemikalije z X-VIVO™ 15. Če se uporabijo druga topila, kot so DMSO, voda ali gojišče, je treba njihovo uporabo znanstveno utemeljiti. Podroben postopek za raztopitev kemikalij je opisan v Dodatku 3.5. Raztopine z X-VIVO™ 15, opisane v odstavkih od 18 do 23, se zmešajo v razmerju 1: 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 16).

18. Prva ponovitev preskusa je namenjena določitvi citotoksične koncentracije in preučitvi potenciala kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Z uporabo X-VIVO™ 15 se osnovne raztopine preskusne kemikalije z X-VIVO™ 15 zaporedoma razredčijo s faktorjem redčenja 2 (glej Dodatek 3.5), za kar se uporabi 96-jamični preskusni blok (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Nato se 50 µl/jamico razredčene raztopine doda 50 µl suspenzije celic na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Pri preskusnih kemikalijah, ki so topne v X-VIVO ™ 15, končne koncentracije preskusnih kemikalij torej segajo od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatek 3.5). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v X-VIVO ™ 15 pri 20 mg/ml, se določijo samo faktorji redčenja, ki segajo od 2 do 2^{10}, čeprav dejanske končne koncentracije preskusnih kemikalij ostanejo negotove in so odvisne od nasičene koncentracije preskusnih kemikalij v osnovni raztopini z X-VIVO ™ 15.

19. V naslednjih ponovitvah preskusa (tj. drugi, tretji in četrti ponovitvi) se osnovna raztopina z X-VIVO™ 15 pripravi pri koncentraciji, ki je 4-krat višja od koncentracije viabilnosti celic 05 (CV05; najnižja koncentracija, pri kateri Inh-GAPLA postane < 0,05) v prvem poskusu. Če se Inh-GAPLA ne zniža pod 0,05 pri najvišji koncentraciji v prvi ponovitvi, se osnovna raztopina z X-VIVO™ 15 pripravi pri najvišji koncentraciji prve ponovitve. Koncentracija CV05 se izračuna z delitvijo koncentracije osnovne raztopine v prvi ponovitvi s faktorjem redčenja za CV05 (X) (faktor redčenja CV05 (X); faktor redčenja, potreben za razredčenje osnovne raztopine na CV05) (glej Dodatek 3.5). Za preskusne snovi, ki niso topne v X-VIVO pri 20 mg/ml, se CV05 določi s koncentracijo osnovne raztopine × 1/X. Pri ponovitvah od 2 do 4 se druga osnovna raztopina pripravi kot 4 × CV05 (Dodatek 3.5).

▼M8

20. Zaporedne razredčitve drugih osnovnih raztopin z X-VIVO™ 15 se pripravijo s faktorjem redčenja 1,5, pri čemer se uporabi 96-jamični preskusni blok. Nato se 50 µl/jamico razredčene raztopine doda 50 µl suspenzije celic v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Vsako koncentracijo vsake preskusne kemikalije je treba preskusiti v 4 jamicah. Vzorci se nato zmešajo na stresalniku za plošče in 16 ur inkubirajo pri 37 °C in 5 % CO_2, nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano spodaj.

21. Kontrola s topilom je mešanica 50 µl/jamico X-VIVO™ 15 in 50 µl/jamico suspenzije celic v RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS.

22. Priporočena pozitivna kontrola je 4-NBB. 20 mg 4-NBB se pripravi v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki, v katero se doda X-VIVO™ 15 do 1 ml. Epruveta se najmanj 30 minut energično meša in stresa na rotorju pri največji hitrosti 8 vrt/min. Po 5-minutnem centrifugiranju pri 20 000 g se supernatant razredči s faktorjem 4 z X-VIVO™ 15, 500 µl razredčenega supernatanta pa se prenese v jamico na 96-jamičnem preskusnem bloku. Razredčeni supernatant se nadalje razredči z X-VIVO™ 15 s faktorjema 2 in 4, 50 µl raztopine pa se doda 50 µl suspenzije celic THP-G8 v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom (Dodatek 3.6). Vsako koncentracijo pozitivne kontrole je treba preskusiti v 4 jamicah. Plošča se stresa na stresalniku za plošče in 16 ur inkubira v CO_2-inkubatorju (37 °C, 5 % CO_2), nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano v odstavku 29.

23. Priporočena negativna kontrola je LA. 20 mg LA se pripravi v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki, v katero se doda X-VIVO™ 15 do 1 ml (20 mg/ml). Raztopina z LA s koncentracijo 20 mg/ml se razredči s faktorjem 5 z X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl te raztopine z LA s koncentracijo 4 mg/ml se prenese na 96-jamični preskusni blok. Ta raztopina se razredči s faktorjem 2 z X-VIVO™ 15 in nato znova s faktorjem 2, da se dobita raztopini 2 mg/ml in 1 mg/ml. 50 µl teh treh raztopin in kontrola z vehiklom (X-VIVO™ 15) se doda 50 µl suspenzije celic THP-G8 v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Vsako koncentracijo negativne kontrole je treba preskusiti v 4 jamicah. Plošča se stresa na stresalniku za plošče in 16 ur inkubira v CO_2-inkubatorju (37 °C, 5 % CO_2), nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano v odstavku 29.

24. Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne ali negativne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev.

25. Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusnimi kemikalijami, npr. z zatesnitvijo plošče pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami.

26. Za preskusne kemikalije in kontrolo s topilom so potrebne od 2 do 4 ponovitve, da se izpelje pozitivna ali negativna napoved (glej preglednico 2). Vsaka ponovitev se izvede na drug dan s svežo osnovno raztopino preskusnih kemikalij z X-VIVO™ 15 in neodvisno odvzetimi celicami. Celice lahko sicer izhajajo iz iste pasaže.

▼M8

Meritve luciferazne aktivnosti

27. Luminiscenca se meri z luminometrom za mikrotitrske 96-jamične plošče, opremljenim z optičnimi filtri, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japonska), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Nemčija) in serija ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, ZDA). Luminometer mora biti umerjen za vsak preskus, da se zagotovi obnovljivost (19). Za to umerjanje so na voljo rekombinantne luciferaze, ki oddajajo oranžno in rdečo svetlobo.

28. 100 µl predhodno segretega luciferaznega reagenta Tripluc® (Tripluc) se prenese v vsako jamico na plošči, ki vsebuje suspenzijo celic, tretirano s kemikalijo ali brez kemikalije. Plošča se stresa 10 minut pri sobni temperaturi približno 20 °C. Plošča se vstavi v luminometer, da se izmeri luciferazna aktivnost. Bioluminiscenca se meri po 3 sekunde v odsotnosti (F0) in prisotnosti (F1) optičnega filtra. Če se uporabijo drugačne nastavitve, npr. glede na uporabljeni model luminometra, jih je treba utemeljiti.

29. Parametri za vsako koncentracijo se izračunajo iz izmerjenih vrednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednji ±SD IL8LA, srednji ±SD GAPLA, srednji ±SD nIL8LA, srednji ±SD Ind-IL8LA, srednji ±SD Inh-GAPLA in 95-odstotni interval zaupanja za Ind-IL8LA. Opredelitve parametrov, uporabljenih v tem odstavku, so navedene v dodatkih 3.1 in 3.4.

30. Pred meritvijo se običajno doseže barvno razlikovanje v večbarvnih poročevalskih poskusih z uporabo detektorjev (luminometer in čitalec plošče), opremljenih z optičnimi filtri, kot so ozko pasovno omejeni (dolgovalovni ali kratkovalovni prepustni) filtri ali pasovnoprepustni filtri. V skladu z Dodatkom 3.2 je treba koeficiente prepustnosti filtrov umeriti za vsako signalno barvo bioluminiscence.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

31. V skladu z merili za pozitivno/negativno odločitev je treba v vsaki ponovitvi:

— napoved preskusa IL-8 Luc oceniti kot pozitivno, če ima preskusna kemikalija Ind-IL8LA $\geq$ 1,4 in je spodnja meja 95-odstotnega intervala zaupanja Ind-IL8LA $\geq$ 1,0;

— napoved preskusa IL-8 Luc oceniti kot negativno, če ima preskusna kemikalija Ind-IL8LA $<$ 1,4 in/ali je spodnja meja 95-odstotnega intervala zaupanja Ind-IL8LA $<$ 1,0.

Napovedni model

32. Preskusne kemikalije, ki dajo pri prvi, drugi, tretji ali četrti ponovitvi dva pozitivna rezultata, se opredelijo kot pozitivne, medtem ko se preskusne kemikalije, ki dajo pri prvi, drugi, tretji ali četrti ponovitvi tri negativne rezultate, opredelijo kot domnevno negativne (preglednica 2). Med domnevno negativnimi kemikalijami se kemikalije, ki se raztopijo pri 20 mg/ml X-VIVO™ 15, ocenijo kot negativne, medtem ko se kemikalije, ki se ne raztopijo pri 20 mg/ml X-VIVO™ 15, ne smejo upoštevati (slika 1).

▼M8

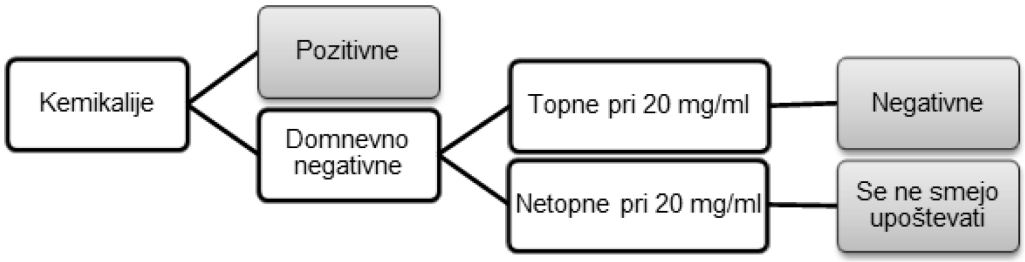
Preglednica 2

Merila za opredelitev pozitivnih in domnevno negativnih kemikalij

1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev	4. ponovitev	Končna napoved
pozitivna	pozitivna	–	–	pozitivna
	negativna	pozitivna	–	pozitivna
		negativna	pozitivna	pozitivna
			negativna	domnevno negativna
negativna	pozitivna	pozitivna	–	pozitivna
		negativna	pozitivna	pozitivna
			negativna	domnevno negativna
	negativna	pozitivna	pozitivna	pozitivna
			negativna	domnevno negativna
		negativna	–	domnevno negativna

Slika 1

Napovedni model za končno oceno



Merila za sprejemljivost

33. Pri uporabi preskusa IL-8 Luc morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost.

— Ind-IL8LA mora biti večji od 5,0 pri vsaj eni koncentraciji pozitivne kontrole, tj. 4-NBB, in to v vsaki ponovitvi.

— Ind-IL8LA mora biti manjši od 1,4 pri kateri koli koncentraciji negativne kontrole, tj. mlečne kisline, in to v vsaki ponovitvi.

— Podatke s plošč, za katere je GAPLA kontrolnih jamic s celicami in Triplucom, vendar brez kemikalij, manjši od 5-kratnika GAPLA jamice, ki vsebuje samo preskusno gojišče (50 µl/jamico RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS, in 50 µl/jamico X-VIVO^{TM} 15), je treba zavrniti.

— Podatke s plošč, za katere je Inh-GAPLA vseh koncentracij preskusnih ali kontrolnih kemikalij manjši od 0,05, je treba zavrniti. V takem primeru je treba prvi preskus ponoviti, tako da je najvišja končna koncentracija ponovljenega preskusa najnižja končna koncentracija prejšnjega preskusa.

▼M8

Poročilo o preskusu

34. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusne kemikalije

Snov iz ene sestavine:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— topnost v X-VIVO™ 15. Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15, ali sta po centrifugiranju ugotovljena obarjanje ali flotacija;

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo, če X-VIVO™ 15 ni bil uporabljen.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;

— molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— topnost v X-VIVO™ 15. Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15, ali sta po centrifugiranju ugotovljena obarjanje ali flotacija;

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo, če X-VIVO™ 15 ni bil uporabljen.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

— fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;

▼**M8**

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);

— preskušene koncentracije;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola:

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;

— čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

— fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druge negativne kontrole razen tistih, ki so navedene v smernici za preskušanje, in če so na voljo;

— pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

— utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo.

Preskusni pogoji:

— ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;

— opis uporabljenega preskusa;

— uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);

— številka serije in izvor FBS, ime dobavitelja, številka serije črne 96-jamične plošče z ravnim dnom ter številka serije reagenta Tripluc;

— število pasaž in gostota celic, uporabljenih za preskušanje;

— metoda štetja celic, uporabljena za nasaditev pred preskušanjem, in ukrepi, sprejeti za zagotovitev homogene porazdelitve števila celic;

— uporabljeni luminometer (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, uporabljenim substratom luciferaze in prikazom ustreznih meritev luminiscence, ki temeljijo na kontrolnem preskusu, opisanem v Dodatku 3.2;

— postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju.

Preskusni postopek:

— število ponovljenih vzorcev in izvedenih ponovitev;

— uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, postopek dodajanja in čas izpostavljenosti (če so drugačni od priporočenih);

▼**M8**

— opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;

— opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;

— opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

— meritve IL8LA in GAPLA;

— izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA in Inh-GAPLA;

— 95-odstotni interval zaupanja Ind-IL8LA;

— graf, ki prikazuje krivulje odziva na odmerek za indukcijo luciferazne aktivnosti in viabilnost;

— opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

— razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom IL-8 Luc;

— obravnavanje rezultatov preskusa v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

Sklepna ugotovitev

VIRI

(1) Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., in Aiba, S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment (št. 267), ENV/JM/MONO(2017)19. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment (št. 258), ENV/JM/MONO(2017)20. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment (št. 256), ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van Loveren, H., in Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., in Aiba, S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., in Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D. A., Asturiol, D., Roberts, D. W., Lepoittevin, J.-P., Worth, A., in Aschberger, K. (2016). Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016).Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Pariz.http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku, M., in Ohmiya, Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani, V. R., Bechara, E. J., in Ohmiya, Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, A., Kubota, H., Ikeda, M., in Ohmiya, Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). Še ni objavljeno – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariz, Francija.

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment (št. 34). OECD, Pariz, Francija.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, na voljo na: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V. R., in Ohmiya, Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 168). OECD, Pariz, Francija.

(21) Združeni narodi (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Šesta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼M8

Dodatek 3.1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti.Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (16).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (20).

Kemikalija: snov ali zmes.

CV05: viabilnost celic 05, tj. najmanjša koncentracija, pri kateri je Inh-GAPLA kemikalij manjša od 0,05.

FInSLO-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na Ind-IL8LA.Glej Ind-IL8LA za opredelitev pojma.

GAPLA: luciferazna aktivnost stabilne luciferaze rdeča (SLR) (λmaks. = 630 nm), ki jo regulira promotor GAPDH ter izkazuje viabilnost celic in število viabilnih celic.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

II-SLR-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na Inh-GAPLA.Glej Inh-GAPLA za opredelitev pojma.

IL-8 (interlevkin-8): citokin, ki izhaja iz endotelijskih celic, fibroblastov, keratinocitov, makrofagov in monocitov ter povzroča kemotakso nevtrofilcev in limfocitov T.

IL8LA: luciferazna aktivnost stabilne luciferaze oranžna (SLO) (λmaks. = 580 nm), ki jo regulira promotor IL-8.

Ind-IL8LA: stopnja indukcije nIL8LA. Dobi se z delitvijo nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami, z nIL8LA nestimuliranih celic THP-G8 in predstavlja indukcijo aktivnosti promotorja IL-8 s strani kemikalij.

Inh-GAPLA: inhibicija GAPLA.Dobi se z delitvijo GAPLA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami, z GAPLA netretiranih celic THP-G8 in predstavlja citotoksičnost kemikalij.

Najnižji prag indukcije (MIT): najnižja koncentracija, pri kateri kemikalija izpolnjuje pozitivna merila.

▼M8

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije.Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

nIL8LA: aktivnost luciferaze SLO, ki izraža aktivnost promotorja IL-8 (IL8LA), normalizirana z aktivnostjo luciferaze SLR, ki izraža aktivnost promotorja GAPDH (GAPLA).Predstavlja aktivnost promotorja IL-8 po upoštevanju viabilnosti celic ali števila celic.

nSLO-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na nIL8LA.Glej nIL8LA za opredelitev pojma.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv.Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti previsoka.

Prehapteni: kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo.

Prohapteni: kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, da bi uresničevale potencial za povzročanje preobčutljivosti kože.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek.Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (16).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola.Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (16).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušenih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo.Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (16).

SLO-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na IL8LA.Glej IL8LA za opredelitev pojma.

SLR-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na GAPLA.Glej GAPLA za opredelitev pojma.

▼M8

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu.Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo.Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (16).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Površinsko aktivna snov: snov, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo.(TG437)

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te metode.

THP-G8: reporterska celična linija IL-8, uporabljena v preskusu IL-8 Luc.Humana makrofagna celična linija THP-1 je bila transfecirana z luciferaznima genoma SLO in SLR pod kontrolo promotorjev IL-8 oziroma GAPDH.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (21).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljavna preskusna metoda: preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih.Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom.

▼**M8**

Dodatek 3.2

NAČELO MERITVE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI IN DOLOČITEV KOEFICIENTOV PREPUSTNOSTI OPTIČNEGA FILTRA ZA SLO IN SLR

MultiReporter Assay System – Tripluc se lahko uporabi z luminometrom za mikrotitrske plošče z večbarvnim sistemom zaznavanja, s katerim je lahko opremljen optični filter (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Optični filter, ki se uporabi pri meritvi, je 600–620-nanometrski dolgovalovni ali kratkovalovni prepustni filter ali 600–700-nanometrski pasovnoprepustni filter.

Meritev dvobarvnih luciferaz z optičnim filtrom

To je primer uporabe filtra Phelios AB-2350 (ATTO). Ta luminometer je opremljen s 600-nanometrskim dolgovalovnim prepustnim filtrom (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) za razdelitev luminiscence SLO (λmaks. = 580 nm) in SLR (λmaks. = 630 nm).

Za določitev koeficientov prepustnosti 600-nanometrskega LP se najprej z uporabo prečiščenih luciferaznih encimov SLO in SLR izmeri (i) intenziteta bioluminiscence SLO in SLR brez filtra (F0), (ii) intenziteta bioluminiscence SLO in SLR pri prehodu čez 600-nanometrski LP (filter 1) in (iii) izračunata koeficienta prepustnosti 600-nanometrskega LP za SLO in SLR, navedena spodaj.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Kadar je intenziteta SLO in SLR v preskusnem vzorcu opredeljena kot O oziroma R, se (i) intenziteta svetlobe brez filtra (vse optično) F0 in (ii) intenziteta svetlobe, ki prehaja skozi 600-nanometrski LP (filter 1) F1, opišeta, kot je navedeno spodaj.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Ti formuli je mogoče zapisati tudi tako:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Z uporabo izračunanih faktorjev prepustnosti (κO_{R60} in κR_{R60}) ter izmerjenih F0 in F1 se lahko nato vrednost O in R izračuna tako:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼**M8**

Materiali in metode za določitev faktorja prepustnosti

(1) Reagenti

Enkratna prečiščena encima luciferaze:

liofilizirani prečiščeni encim SLO

liofilizirani prečiščeni encim SLR

(ki sta bila za validacijsko delo pridobljena od GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska, s celično linijo THP-G8)

Preskusni reagent:

luciferazni reagent Tripluc® (na primer iz TOYOBO Cat#MRA-301)

Gojišče: za luciferazni preskus (30 ml, shranjeno pri od 2 do 8 °C)

Reagent	Konc.	Končna konc. v gojišču	Potrebna količina
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

(2) Priprava encimske raztopine

Lifolizirani prečiščeni encim luciferaze raztopite v epruveti, tako da dodate 200 µl 10~100 mM Tris/HCl ali Hepes/HCl (pH 7,5~8,0) z dodatkom 10 % (w/v) glicerola, encimsko raztopino razdelite na 10-mikrolitrske alikvote v 1,5-mililitrske epruvete za enkratno uporabo ter jih shranite v zamrzovalniku pri –80 °C. Zamrznjena encimska raztopina je uporabna do 6 mesecev. Ob uporabi dodajte 1 ml gojišča za luciferazni preskus (RPMI-1640 z 10 % FBS) v vsako epruveto, v kateri je encimska raztopina (razredčena encimska raztopina), in jih hranite na hladnem, da preprečite deaktivacijo.

(3) Meritev bioluminiscence

Luciferazni reagent Tripluc® (Tripluc) odtajajte in ga hranite pri sobni temperaturi bodisi v vodni kopeli bodisi pri temperaturi zraka okolice. Luminometer vključite 30 minut pred začetkom meritve, da omogočite stabilizacijo fotopomnoževalnika. 100 µl razredčene encimske raztopine prenesite na črno 96-jamično ploščo (ravno dno) (referenčni vzorec SLO na #B1, #B2, #B3, referenčni vzorec SLR na #D1, #D2, #D3). Nato s pipetmanom prenesite 100 µl predhodno segretega reagenta Tripluc v vsako jamico na plošči, ki vsebuje razredčeno encimsko raztopino. Ploščo s stresalnikom plošč 10 minut stresajte pri sobni temperaturi (približno 25 °C). Iz raztopin v jamicah odstranite mehurčke, če se pojavijo. Ploščo vstavitev v luminometer, da se izmeri luciferazna aktivnost. Bioluminiscenca se meri po 3 sekunde v odsotnosti (F0) in prisotnosti (F1) optičnega filtra.

Koeficient prepustnosti optičnega filtra je bil izračunan tako:

koeficient prepustnosti (SLO (κO_{R60})) = (#B1 F1+ #B2 F1+ #B3 F1)/(#B1 F0+ #B2 F0+ #B3 F0)

▼**M8**

koeficient prepustnosti (SLR (κR_{R60})) = (#D1 F1+ #D2 F1+ #D3 F1) / (#D1 F0+ #D2 F0+ #D3 F0)

Izračunani faktorji prepustnosti se uporabijo za vse meritve, izvedene z istim luminometrom.

Nadzor nad kakovostjo opreme

Uporabiti je treba postopke, opisane v protokolu IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Dodatek 3.3

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pridobijo napovedi preskusa IL-8 Luc, pričakovane za 9 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti, ki so za vsaj 8 od 9 snovi za preverjanje usposobljenosti (izbranih za predstavljanje območja odzivov za nevarnosti za preobčutljivost kože) v ustreznem referenčnem območju. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusom IL-8 Luc. Za preskus IL-8 Luc so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (6) (1).

Preglednica 1:

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za poskus IL-8 Luc

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Stanje	Topnost v X-VIVO15 pri 20 mg/ml	Napoved *in vivo* (1)	Napoved IL-8 Luc (2)	Referenčno območje **(µg/ml)** (3)	
						CV_{05} (4)	MIT IL-8 Luc (5)
2,4-dinitroklorobenzen	97-00-7	trdna snov	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močen)	pozitivna	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehid	50-00-0	tekočina	topen	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	pozitivna	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trdna snov	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	250–290	60–250
etilendiamin	107-15-3	tekočina	topen	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	500–700	0,1–0,4
etilenglikol dimetakrilat	97-90-5	tekočina	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	> 2000	0,04–0,1
4-alilanizol (estragol)	140-67-0	tekočina	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	> 2000	0,01–0,07
streptomicin sulfat	3810-74-0	trdna snov	topen	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 2000	> 2000
glicerol	56-81-5	tekočina	topen	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 2000	> 2000
izopropanol	67-63-0	tekočina	topen	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 2000	> 2000

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov.
(1) Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (19).
(2) Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (1) (6).
(3) CV_{05} in MIT IL-8 Luc sta bila izračunana z uporabo topnosti v vodi, pridobljeno z EPI Suite™.
(4) CV_{05}: najnižja koncentracija, pri kateri je Inh-GAPLA kemikalij manjša od 0,05.
(5) MIT: najnižje koncentracije, pri katerih kemikalija izpolnjuje pozitivna merila.

▼M8

Dodatek 3.4

INDEKSI IN MERILA ZA PRESOJO

nIL8LA (nSLO-LA)

J-ta ponovitev (j = 1–4) i-te koncentracije (i = 0–11) se izmeri za IL8LA (SLO-LA) oziroma GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, navedena kot nIL8LA (nSLO-LA), je opredeljena kot:

To je osnovna merska enota v tem preskusu.

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Primarno merilo tega preskusa je stopnja povečanja povprečne nIL8LA (nSLO-LA) za ponovitev pri i-ti koncentraciji v primerjavi z njo pri koncentraciji 0, tj. Ind-IL8LA. To razmerje je zapisano z naslednjo formulo:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Vodilni laboratorij je predlagal, naj vrednost 1,4 ustreza pozitivnemu rezultatu za preskusno kemikalijo. Ta vrednost temelji na preiskavi preteklih podatkov vodilnega laboratorija. Ekipa za upravljanje podatkov je nato to vrednost uporabila v vseh fazah validacijske študije. Glavni rezultat, Ind-IL8LA, je razmerje dveh aritmetičnih sredin, kot je prikazano v enačbi.

95-odstotni interval zaupanja (95 % CI)

Za 95-odstotni interval zaupanja (95 % CI), ki temelji na razmerju, se lahko šteje, da prikazuje natančnost tega primarnega merila izida. Spodnja meja 95 % CI ≥ 1 kaže, da je nIL8LA pri i-ti koncentraciji bistveno večja kot pri kontroli s topilom. 95 % CI je mogoče oblikovati na več načinov. V tej študiji smo uporabili metodo, znano kot Fiellerjev teorem. Ta teorem 95-odstotnega intervala zaupanja izhaja iz naslednje formule:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

pri čemer je:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$ 97,5 percentila osrednje t-porazdelitve z ν stopnjo svobode, pri čemer je

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je razmerje med povprečno GAPLA (SLR-LA) za ponovitev pri i-ti koncentraciji in povprečno GAPLA pri kontroli s topilom, ki se zapiše tako:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

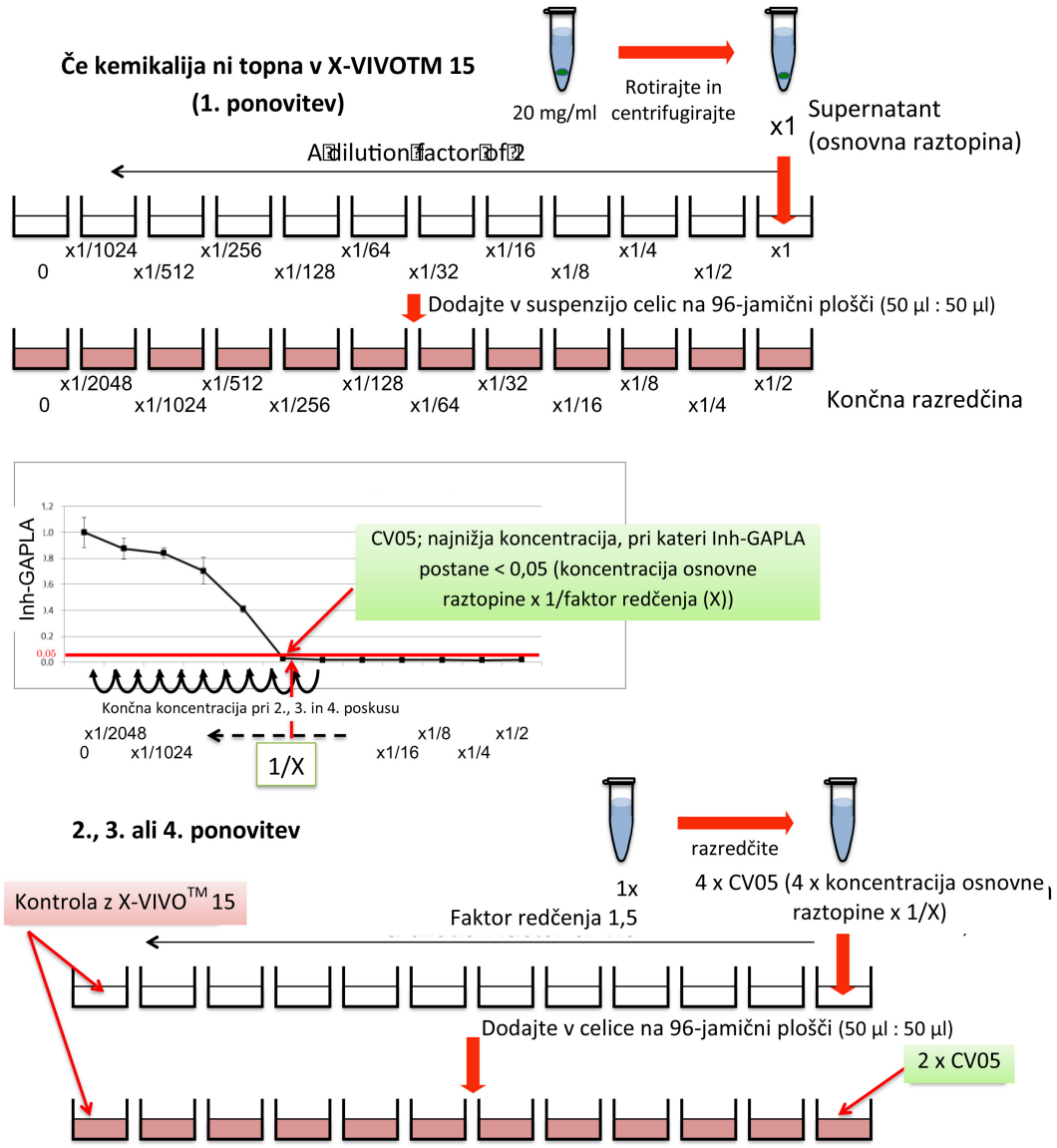
Ker je GAPLA imenovalec nIL8LA, zelo majhna vrednost povzroči veliko spremembo v nIL8LA. Zato se lahko vrednosti Ind-IL8LA z zelo majhno vrednostjo Inh-GAPLA (manj kot 0,05) štejejo za nenatančne.

▼M8

Dodatek 3.5

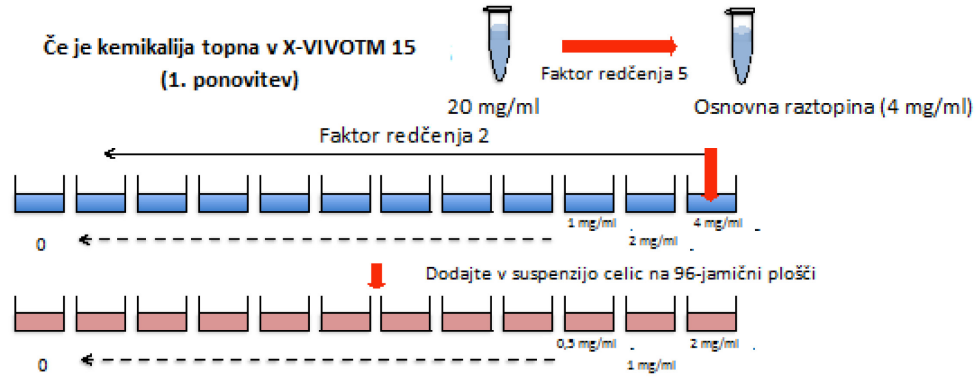
SHEMA METOD ZA RAZTOPITEV KEMIKALIJ ZA PRESKUS IL-8 LUC

(a) Za kemikalije, raztopljene v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml

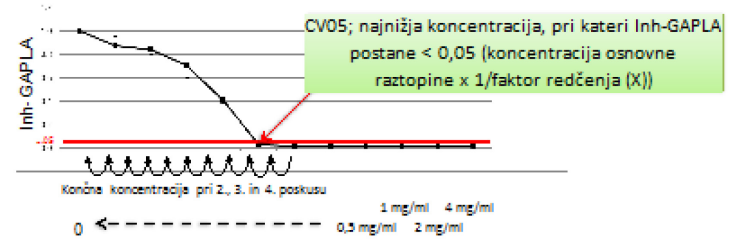


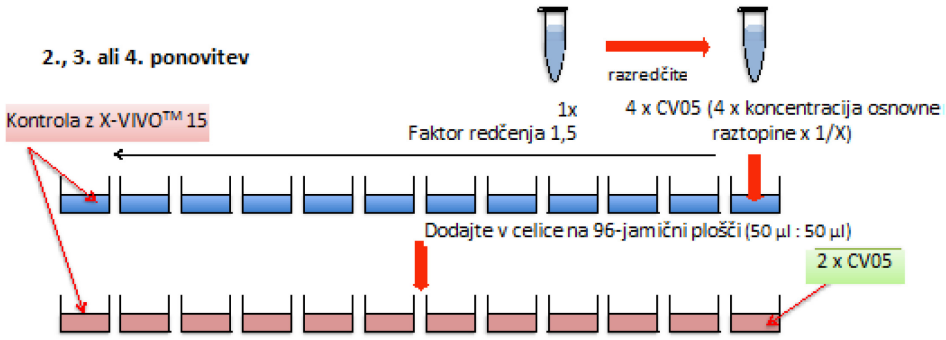
▼**M8**

(b) Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



Določite najvišjo koncentracijo naslednjih poskusov

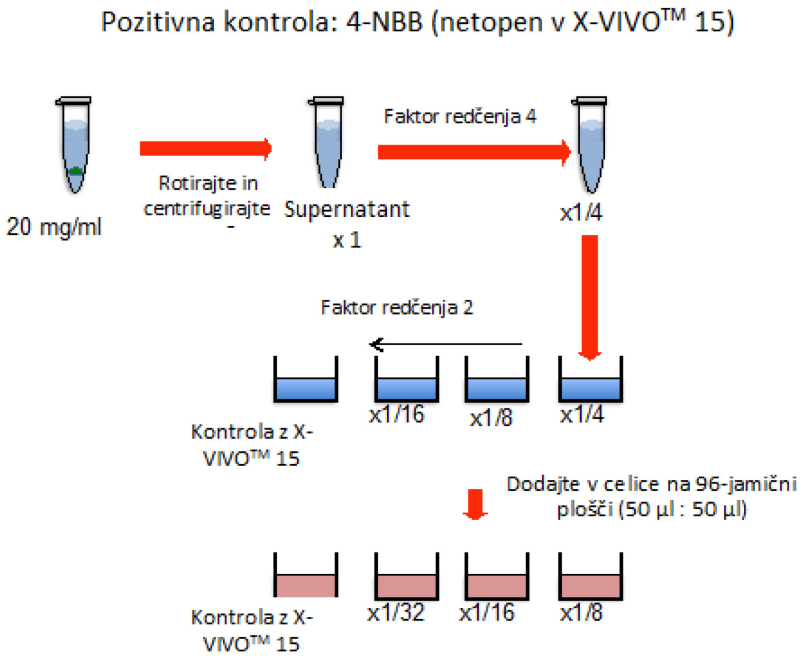




▼**M8**

Dodatek 3.6

SHEMA METODE ZA RAZTOPITEV 4-NBB ZA POZITIVNO KONTROLO PRESKUSA IL-8 LUC



▼B

PRILOGA

DEL C: METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI ZA OKOLJE

KAZALO

C.1	AKUTNA STRUPENOST ZA RIBE
C.2	PRESKUS AKUTNE IMOBILIZACIJE VODNIH BOLH *(DAPHNIA* SP.)
C.3	SLADKOVODNE ALGE IN CIANOBAKTERIJE, PRESKUS ZAVIRANJA RASTI
C.4	DOLOČANJE „DOBRE“ BIORAZGRADLJIVOSTI
DEL I	SPLOŠNO
DEL II	PRESKUS UPADANJA DOC (METODA C.4-A)
DEL III	PRILAGOJENI PRESEJALNI PRESKUS OECD (METODA C.4-B)
DEL IV	PRESKUS RAZVIJANJA CO_2 (METODA C.4-C)
DEL V	PRESKUS MANOMETRIČNE RESPIROMETRIJE (METODA C.4-D)
DEL VI	PRESKUS Z ZAPRTO STEKLENICO (METODA C.4-E)
DEL VII	PRESKUS M.I.T.I. (METODA C.4-F)
C.5	RAZGRADNJA – BIOKEMIJSKA POTREBA PO KISIKU
C.6	RAZGRADNJA – KEMIJSKA POTREBA PO KISIKU
C.7	RAZGRADNJA – ABIOTSKA RAZGRADNJA: HIDROLIZA KOT FUNKCIJA pH
C.8	STRUPENOST ZA DEŽEVNIKE
C.9	BIORAZGRADNJA – ZAHN-WELLENSEV PRESKUS
C.1O	SIMULACIJSKI PRESKUS ZA AEROBNO ČIŠČENJE ODPADNE VODE: C.10-A: ENOTE Z AKTIVNIM BLATOM – C.10-B: BIOFILMI
C.11	AKTIVNO BLATO, PRESKUS ZAVIRANJA DIHANJA (OKSIDACIJA OGLJIKA IN AMONIJA)
C.12	BIORAZGRADNJA – SPREMENJENI SCAS PRESKUS
C.13	BIOAKUMULACIJA V RIBAH: VODNA IN PREHRANSKA IZPOSTAVLJENOST
C.14	PRESKUS RASTI RIBJIH MLADIC
C.15	RIBE, PRESKUS KRATKOTRAJNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIIH IN MLADICAH S HRANILNIM MEŠIČKOM
C.16	ČEBELE DELAVKE – PRESKUS AKUTNE ORALNE TOKSIČNOSTI
C.17	ČEBELE DELAVKE – PRESKUS AKUTNE KONTAKTNE TOKSIČNOSTI
C.18	ADSORPCIJA/DESORPCIJA Z UPORABO METODE ŠARŽNIH PRESKUSOV RAVNOTEŽJA

▼B

C.19	OCENJEVANJE ADSORPCIJSKEGA KOEFICIENTA (K_{OC}) TAL IN ODPADNEGA BLATA (BLATA IZ ČISTILNIH NAPRAV) S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
C.20	PRESKUS RAZMNOŽEVANJA VRSTE *DAPHNIA MAGNA*
C.21	TALNI MIKROORGANIZMI: PRESKUS TRANSFORMACIJE DUŠIKA
C.22	TALNI MIKROORGANIZMI: PRESKUS TRANSFORMACIJE OGLJIKA
C.23	AEROBNA IN ANAEROBNA TRANSFORMACIJA V TLEH
C.24	AEROBNA IN ANAEROBNA TRANSFORMACIJA V SISTEMIH VODNIH USEDLIN
C.25	AEROBNA MINERALIZACIJA V POVRŠINSKI VODI – SIMULACIJSKI PRESKUS BIORAZGRADNJE
C.26	PRESKUS ZAVIRANJA RASTI VRSTE *LEMNA*
C.27	PRESKUS STRUPENOSTI S TRZAČAMI V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO USEDLINE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO
C.28	PRESKUS STRUPENOSTI S TRZAČAMI V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO VODE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO
C.29	DOBRA BIORAZGRADLJIVOST – CO_2 V ZAPRTIH POSODAH (PRESKUS NADPROSTORA)
C.30	BIOAKUMULACIJA V KOPENSKIH MALOŠČETINCIH
C.31	PRESKUS KOPENSKIH RASTLIN: PRESKUS VZNIKA IN RASTI SEJANCEV
C.32	PRESKUS RAZMNOŽEVANJA ENHITREJEV
C.33	PRESKUS RAZMNOŽEVANJA DEŽEVNIKOV (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)
C.34	DOLOČANJE ZAVIRANJA DELOVANJA ANAEROBNIH BAKTERIJ – ZMANJŠANJE NASTAJANJA PLINA IZ ANAEROBNO GNIJOČEGA BLATA (IZ ODPLAK)
C.35	PRESKUS STRUPENOSTI Z VRSTO *LUMBRICULUS* V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO USEDLIN S PRIMEŠANO PRESKUSNO KEMIKALIJO
C.36	PRESKUS RAZMNOŽEVANJA PLENILSKE PRŠICE (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) V TLEH
C.37	21-DNEVNI PRESKUS RIB: KRATKOTRAJNO PRESEJALNO PRESKUŠANJE ESTROGENEGA IN ANDROGENEGA DELOVANJA TER ZAVIRANJA AROMATAZE
C.38	PRESKUS PREOBRAZBE DVOŽIVK
C.39	PRESKUS RAZMNOŽEVANJA SKAKAČEV V TLEH

▼B

C.40	PRESKUS STRUPENOSTI ŽIVLJENJSKEGA CIKLA S TRZAČAMI V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO VODE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO ALI USEDLINE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO
C.41	PRESKUS SPOLNEGA RAZVOJA RIB
C.42	BIOLOŠKA RAZGRADLJIVOST V MORSKI VODI
C.43	ANAEROBNA BIOLOŠKA RAZGRADLJIVOST ORGANSKIH SNOVI V PREGNITEM BLATU: Z MERJENJEM NASTAJANJA PLINA
C.44	IZPIRANJE V TALNIH KOLONAH
C.45	OCENA EMISIJ IZ LESA, TRETIRANEGA S SREDSTVI ZA ZAŠČITO LESA, V OKOLJE: LABORATORIJSKA METODA ZA LESNE PROIZVODE, KI NISO PREKRITI IN SO V STIKU S SLADKO VODO ALI MORSKO VODO
C.46	BIOAKUMULACIJA V BENTOŠKIH MALOŠČETINCIH, KI ŽIVIJO V USEDLINAH
C.47	RIBE, PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA ZGODNJE RAZVOJNE STOPNJE
C.48	KRATKOTRAJNI PRESKUS RAZMNOŽEVANJA RIB
C.49	PRESKUS AKUTNE TOKSIČNOSTI RIBJEGA ZARODKA
C.50	PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA KLASASTI RMANEC (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*) BREZ USEDLINE
C.51	PRESKUS TOKSIČNOSTI VODE IN USEDLINE ZA KLASASTI RMANEC (*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*)
C.52	RAZŠIRJENI ENOGENERACIJSKI PRESKUS RAZMNOŽEVANJA MEDAKE (MEOGRT)
C.53	PRESKUS RASTI IN RAZVOJA LIČINK DVOŽIVK (LAGDA)

▼B

C.1 AKUTNA STRUPENOST ZA RIBE

1. METODA

1.1 UVOD

Namen tega preskusa je določiti akutno smrtno strupenost snovi za ribe v sladki vodi. Za pomoč pri izbiranju najbolj primerne preskusne metode (statična, polstatična ali pretočna), da se zagotovijo zadovoljivo konstantne koncentracije preskusne snovi v času preskusa, je zaželeno, da je na voljo čim več informacij o topnosti v vodi, parnem tlaku, kemični stabilnosti, disociacijski konstanti in biorazgradljivosti snovi.

Pri načrtovanju preskusa in pri razlagi rezultatov je treba upoštevati tudi dodatne informacije (na primer strukturno formulo, stopnjo čistosti, vrsto in odstotek bistvenih nečistot, prisotnost in količino dodatkov ter porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Akutna strupenost je zaznaven škodljiv učinek, ki ga v kratkem času (nekaj dneh) v organizmu povzroči izpostavljenost snovi. V tem preskusu je akutna strupenost izražena kot srednja smrtna koncentracija (LC_{50}), to je koncentracija v vodi, ki povzroči pogin 50 % rib v preskusni skupini med neprekinjeno izpostavljenostjo, katere trajanje mora biti navedeno.

Vse koncentracije preskusne snovi so navedene v masi na volumen (miligramih na liter). Lahko se izrazijo tudi v masi na maso ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3 REFERENČNE SNOVI

Za dokazovanje, da se odziv preskusne vrste v laboratorijskih preskusnih pogojih ni bistveno spremenil, se lahko preskusi referenčna snov.

Za ta preskus ni določena nobena referenčna snov.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Lahko se izvede mejni preskus s 100 mg na liter, v dokaz, da je LC_{50} večji od te koncentracije.

Ribe se za 96 ur izpostavijo preskusni snovi, dodani vodi, v nizu koncentracij. Smrtni primeri se zapišejo v najmanj 24-urnih intervalih, in kadar je mogoče, se za vsak čas opazovanja izračunajo koncentracije, pri katerih pogine 50 % rib (LC_{50}).

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Merila kakovosti se uporabljajo za mejni preskus in za popolni preskus.

Ob koncu preskusa smrtnost v kontrolnih vzorcih ne sme biti večja od 10 % (oziroma ene ribe, če se uporabi manj kot deset rib).

Ves čas preskusa mora biti koncentracija raztopljenega kisika več kot 60 % nasičenosti zraka.

▼B

Ves čas preskusa se koncentracije preskusne snovi vzdržujejo v območju 80 % začetnih koncentracij.

Pri snoveh, ki se lahko topijo v preskusnem mediju in dajejo stabilne raztopine, t.j. snovi, ki ne bodo znatno hlapele, se razgradile, hidrolizirale ali adsorbirale, se šteje, da je začetna koncentracija enakovredna nazivni koncentraciji. Priložijo se dokazi, da so se koncentracije vzdrževale ves čas preskusa in so bila izpolnjena merila kakovosti.

Pri snoveh, ki:

(i) so slabo topne v preskusnem mediju ali

(ii) so zmožne tvoriti stabilne emulzije ali disperzije ali

(iii) v vodnih raztopinah niso stabilne,

se šteje, da je začetna koncentracija koncentracija, izmerjena v raztopini (ali, če to tehnično ni izvedljivo, v vodnem stolpcu) na začetku preskusa. Koncentracija se določi po vzpostavitvi ravnotežja, vendar pred vnosom preskusnih rib.

V vsakem od teh primerov, je treba opraviti dodatne meritve med preskusom, da se potrdijo dejanske koncentracije izpostavljenosti ali izpolnitev meril kakovosti.

Vrednost pH se ne sme spreminjati za več kot 1 enoto.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Uporabijo se lahko tri vrste postopkov:

Statični preskus:

Preskus strupenosti, pri katerem ni pretoka preskusne raztopine. (Raztopine ostanejo nespremenjene ves čas preskusa.)

Polstatični preskus:

Preskus, pri katerem ni pretoka preskusne raztopine, se pa preskusna raztopina v rednih časovnih presledkih (npr. 24 ur) v celoti obnovi.

Pretočni preskus:

Preskus strupenosti, pri katerem se voda v preskusnih komorah neprestano obnavlja, pri čemer se preskusna snov prenaša z vodo, uporabljeno za obnavljanje preskusnega medija.

1.6.1 **Reagenti**

1.6.1.1 *Raztopine preskusnih snovi*

Osnovne raztopine potrebnih koncentracij se pripravijo z raztopitvijo snovi v deionizirani vodi ali vodi v skladu s točko 1.6.1.2.

Izbrane preskusne koncentracije se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Če se preskušajo velike koncentracije, se snov lahko raztopi neposredno v vodi za redčenje.

▼B

Običajno je treba snovi preskusiti le do meje topnosti. Pri nekaterih snoveh (npr. snoveh, ki so slabo topne v vodi ali imajo visok P_{ow}, ali tistih, ki v vodi tvorijo stabilne disperzije in ne pravih raztopin) je sprejemljivo izvesti preskus pri koncentraciji nad mejo topnosti, da se zagotovi doseganje največje topne/stabilne koncentracije. Pomembno pa je, da ta koncentracija ne bo motila preskusnega sistema (npr. tvorba filma na vodni površini, ki prepreči obnavljanje kisika v vodi itd.).

Pri pripravi osnovnih raztopin snovi, ki so slabo topne v vodi, ali za lažje dispergiranje teh snovi v preskusnem mediju se lahko uporabi ultrazvočno dispergiranje, organska topila, emulgatorji ali disperzijska sredstva. Kadar se uporabijo take pomožne snovi, morajo preskusne raztopine vseh koncentracij vsebovati enako količino pomožne snovi in dodatno kontrolno skupino rib je treba izpostaviti enaki koncentraciji pomožne snovi, kakor je uporabljena v preskusnih skupinah. Koncentracija takih pomožnih snovi mora biti čim manjša in v nobenem primeru ne sme preseči 100 mg na liter preskusnega medija.

Preskus je treba opraviti brez uravnavanja pH. Če obstajajo dokazi o izraziti spremembi pH, se priporoča, da se preskus ponovi z uravnanim pH in rezultati vključijo v poročilo. V tem primeru je treba pH vrednost osnovne raztopine uravnati na pH vrednost vode za redčenje, razen če obstajajo posebni razlogi, da se to ne stori. V ta namen je najbolje uporabiti HCl in NaOH. To uravnavanje pH je treba opraviti tako, da se koncentracija preskusne snovi v osnovni raztopini bistveno ne spremeni. Če uravnava povzroči kemijsko reakcijo ali obarjanje preskusne snovi, je treba o tem poročati.

1.6.1.2 *Voda za vzdrževanje in razredčenje*

Uporabi se lahko pitna voda (ki ni onesnažena s potencialno zdravju škodljivimi koncentracijami klora, težkih kovin ali drugih snovi), kakovostna naravna voda ali obdelana voda (glej Dodatek 1). Priporoča se uporaba vode s skupno trdoto med 50 in 250 mg na liter (kot $CaCO_3$) in pH vrednostjo 6,0 do 8,5.

1.6.2 **Aparatura**

Vse aparature morajo biti izdelane iz kemijsko inertnih materialov.

— sistem za avtomatsko redčenje (za pretočni preskus),

— oksimeter,

— oprema za določanje trdote vode,

— ustrezna aparatura za uravnavanje temperature,

— pH-meter.

1.6.3 **Preskusne ribe**

Ribe morajo biti zdrave in brez očitnih nepravilnosti.

▼B

Uporabljeno vrsto je treba izbrati na podlagi praktičnih meril, kot so njihova razpoložljivost celo leto, lahko vzdrževanje, pripravnost za preskušanje, relativna občutljivost za kemikalije in kakršni koli ekonomski, biološki ali ekološki dejavniki, ki so lahko pomembni. Pri izbiri vrste rib je treba upoštevati tudi potrebo po primerljivosti dobljenih podatkov in obstoječe mednarodne uskladitve (vir 1).

Seznam ribjih vrst, ki se priporočajo za ta preskus, je v Dodatku 2; najbolj primerni vrsti sta cebrica in šarenka.

1.6.3.1 *Vzdrževanje*

Ribe naj po možnosti izvirajo iz ene same jate rib s podobno dolžino in starostjo. Ribe je treba vzdrževati najmanj 12 dni v naslednjih pogojih:

obremenitev:

ustrezna sistemu (kroženje ali pretok) in vrsti rib,

voda:

glej 1.6.1.2,

svetloba:

12 do 16 ur osvetljevanja dnevno,

koncentracija raztopljenega kisika:

najmanj 80 % nasičenosti zraka,

hranjenje:

trikrat tedensko ali vsak dan, 24 ur pred začetkom preskusa pa se hranjenje ustavi.

1.6.3.2 *Smrtnost*

Po 48-urnem obdobju prilagajanja se zapišejo smrtni primeri in uporabijo naslednja merila:

— več kot 10 % populacije v sedmih dneh:

celotna serija se zavrne,

— med 5 in 10 % populacije:

obdobje vzdrževanja se podaljša za sedem dni.

Če ne pride do novih smrtnih primerov, je serija sprejemljiva, v nasprotnem primeru jo je treba zavrniti,

— manj kot 5 % populacije:

serija se sprejme.

1.6.4 **Prilagajanje**

Najmanj sedem dni pred uporabo morajo biti vse ribe izpostavljene vodi z enako kakovostjo in temperaturo, kakor se bo uporabila v preskusu.

▼B

1.6.5 **Preskusni postopek**

Pred dokončnim preskusom se lahko opravi preskus za ugotavljanje območja, namenjen pridobivanju informacij o območju koncentracij, ki se bodo uporabile v glavnem preskusu.

Poleg preskusnega niza se izvede ena kontrola brez preskusne snovi in, če je potrebno, tudi ena kontrola s pomožno snovjo.

Glede na fizikalne in kemijske lastnosti preskusne snovi je treba izbrati ustrezno metodo preskusa, statično, polstatično ali pretočno, tako da so izpolnjena merila kakovosti.

Ribe se izpostavijo snovi na spodaj opisani način:

— trajanje: 96 ur,

— število živali: najmanj 7 na koncentracijo,

— bazeni: s primernim volumnom glede na priporočeno obremenitev,

— obremenitev: za statične in polstatične preskuse je največja priporočena obremenitev 1 g na liter; pri pretočnih sistemih je sprejemljiva tudi večja obremenitev,

— preskusna koncentracija: najmanj 5 koncentracij, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor največ 2,2 in so kolikor je mogoče porazdeljene prek območja od 0 do 100-odstotne smrtnosti,

— voda: glej 1.6.1.2,

— svetloba: 12 do 16 ur osvetljevanja dnevno,

— temperatura: primerna za vrsto (Dodatek 2), vendar v mejah ± 1 °C pri vsakem preskusu,

— koncentracija raztopljenega kisika: najmanj 60 % nasičenosti zraka pri izbrani temperaturi,

— hranjenje: ga ni.

Ribe se pregledajo po prvih 2 do 4 urah in nato v najmanj 24-urnih intervalih. Ribe se štejejo za mrtve, če dotik dela med predrepno in repno plavutjo ne povzroči nobene reakcije in niso opazni dihalni gibi. Mrtve ribe se odstranijo takoj, ko so opažene, in zapišejo se smrtni primeri. Zapišejo se vse opazne nepravilnosti (npr. izguba ravnotežja, spremembe v načinu plavanja, dihanju, pigmentaciji itd.).

Dnevno je treba meriti pH, raztopljeni kisik in temperaturo.

Mejni preskus

Z uporabo postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, se lahko izvede mejni preskus pri 100 mg na liter, v dokaz, da je LC_{50} večji od te koncentracije.

Če ima snov take lastnosti, da koncentracije 100 mg na liter ni mogoče doseči, se mejni preskus izvede s koncentracijo, enako topnosti snovi (ali največji koncentraciji, pri kateri še nastane stabilna disperzija) v uporabljenem mediju (glej tudi točko 1.6.1.1).

▼B

Mejni preskus je treba izvesti s 7 do 10 ribami, z enakim številom v kontrolni(-h) skupini(-ah). (Po binomski teoriji velja, da je pri 10 uporabljenih ribah in smrtnosti 0 verjetnost, da je LC_{50} večji od koncentracije, uporabljene v mejnem preskusu, enaka 99,9 %. Pri 7, 8, ali 9 ribah odsotnost smrtnosti pomeni najmanj 99-odstotno verjetnost, da je LC_{50} večji od uporabljene koncentracije.)

Če se pojavijo smrtni primeri, je treba izvesti popolno študijo. Če se opazijo subletalni učinki, jih je treba navesti v poročilu.

2. **PODATKI IN OCENA**

Za vsako obdobje, ko so bila zapisana opažanja (24, 48, 72 in 96 ur), se na logaritemsko-verjetnostnem papirju izdela graf odstotka smrtnosti za vsako priporočeno obdobje izpostavljanja v odvisnosti od koncentracije.

Kadar je mogoče in za vsak čas opazovanja, je treba po standardnih postopkih oceniti LC_{50} in meje zaupanja ($p = 0,05$); te vrednosti je treba zaokrožiti na eno ali največ dve značilni mesti (primeri zaokrožitve na dve mesti: 170 za 173,5; 0,13 za 0,127; 1,2 za 1,21).

Kadar je naklon krivulje koncentracija/odstotek odziva preveč strm za izračun LC_{50}, zadostuje grafična ocena te vrednosti.

Kadar dve zaporedni koncentraciji pri faktorju 2,2 povzročita samo 0 in 100 % smrtnost, ti dve vrednosti zadostujeta za prikaz območja, v katerem je LC_{50}.

Če se opazi, da ni mogoče ohraniti stabilnosti ali homogenosti preskusne snovi, je treba to navesti v poročilu in upoštevati pri razlagi rezultatov.

3. **POROČANJE**

V poročilo o preskusu se, če je možno, vključijo naslednje informacije:

— informacije o preskusnih ribah (znanstveno ime, sev, dobavitelj, vse predhodne obdelave, velikost in število, uporabljena za vsako preskusno koncentracijo),

— vir in glavne kemijske lastnosti vode za redčenje (pH, trdota, temperatura),

— v primeru snovi, slabo topnih v vodi, metoda priprave osnovne in preskusnih raztopin,

— koncentracija vseh pomožnih snovi,

— seznam uporabljenih koncentracij in vse razpoložljive informacije o stabilnosti preskusne snovi v preskusni raztopini pri uporabljenih koncentracijah,

— če se opravijo kemijske analize, uporabljene metode in dobljeni rezultati,

— rezultati mejnega preskusa, če je bil opravljen,

— razlogi za izbiro uporabljenega preskusnega postopka in podatki o njem (npr. statičen, polstatičen, stopnja odmerjanja, pretok, morebitno prezračevanje, obremenitev z ribami itd.),

▼B

— opis preskusne opreme,

— režim osvetljevanja,

— koncentracija raztopljenega kisika, pH vrednost in temperatura preskusnih raztopin vsakih 24 ur,

— dokazi, da so bila izpolnjena merila kakovosti,

— tabela, ki prikazuje skupno smrtnost pri vsaki koncentraciji in pri kontroli (ali kontroli s pomožno snovjo, če je potrebno) ob vsakem priporočenem času opazovanja,

— graf koncentracija/odstotek odziva ob koncu preskusa,

— če je mogoče, vrednosti LC_{50} za vsak priporočeni čas opazovanja (s 95-odstotnimi mejami zaupanja),

— uporabljeni statistični postopki za določanje vrednosti LC_{50},

— dobljeni rezultati, če se uporabi referenčna snov,

— največja preskusna koncentracija, ki v času preskusa ne povzroči smrti,

— najmanjša preskusna koncentracija, ki v času preskusa povzroči 100-odstotno smrtnost.

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 -Water Quality -Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenossisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWW A-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Dodatek 1

Obdelana voda

Primer ustrezne vode za redčenje

Vse kemikalije morajo biti analitsko čiste.

Voda mora biti destilirana voda dobre kakovosti ali deionizirana voda s prevodnostjo pod 5 μScm^{-1}.

Aparatura za destilacijo vode ne sme vsebovati bakrenih delov.

Osnovne raztopine

$CaCl_2$. $2H_2O$ (kalcijev klorid dihidrat): 11,76 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (magnezijev sulfat heptahidrat): 4,93 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.

$NaHCO_3$ (natrijev hydrogen karbonat): 2,59 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.

KCI (kalijev klorid): 0,23 g
Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.

Obdelana voda za redčenje

Zmešamo po 25 ml vsake od štirih osnovnih raztopin in dopolnimo z vodo do 1 litra.

Prezračujemo, dokler koncentracija raztopljenega kisika ni enaka nasičenosti zraka.

Vrednost pH mora biti 7,8 ± 0,2.

Če je potrebno, pH uravnavamo z NaOH (natrijevem hidroksidu) ali HCl (klorovodikovo kislino).

Tako pripravljeno vodo za redčenje pustimo približno 12 ur in je ne smemo več zračiti.

Vsota ionov Ca in Mg v tej raztopini je 2,5 mmol na liter. Razmerje ionov Ca in Mg je 4:1 ter Na in K 10:1. Skupna alkalnost te raztopine je 0,8 mmol na liter.

Nobeno odstopanje v pripravi vode za redčenje ne sme spremeniti sestave ali lastnosti vode.

▼B

Dodatek 2

Priporočene ribje vrste za preskušanje

Priporočena vrsta	Priporočeno območje temperature preskusa (°C)	Priporočena skupna dolžina preskusne živali (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton–Buchanan), navadna cebrica	20 do 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), črnoglavi pisanec	20 do 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), krap	20 do 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850), medaka	20 do 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), gupi	20 do 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758), sončni ostriž	20 do 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), amerikanka	12 do 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jez	20 do 24	6,0 ± 2,0

Zbiranje

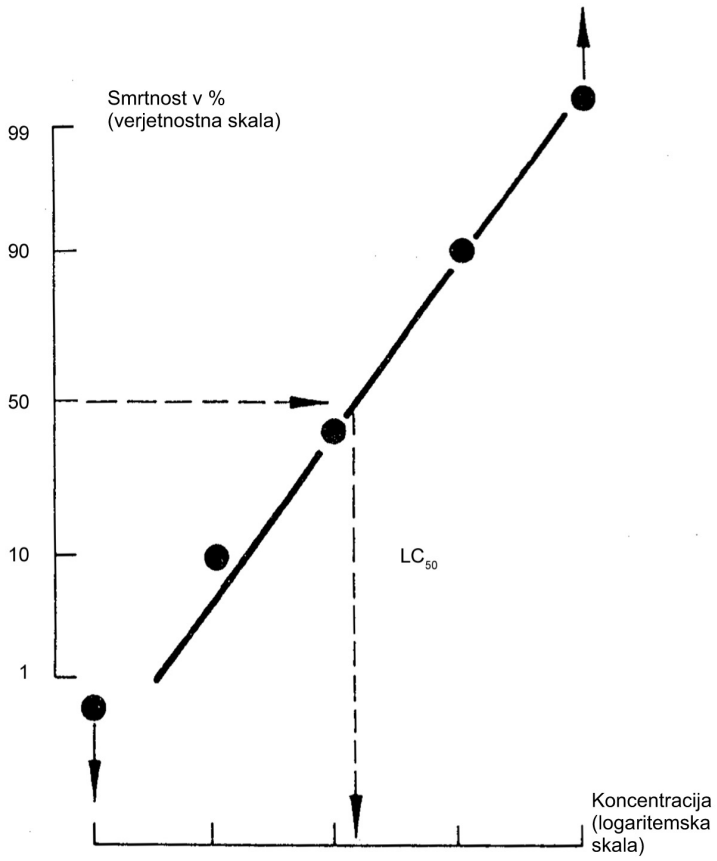
Zgoraj navedene ribe se z lahkoto gojijo in/ali so obče na voljo celo leto. Lahko se razmnožujejo in gojijo bodisi v ribogojnicah bodisi v laboratoriju v pogojih, kjer se nadzorujejo bolezni in zajedavci, tako da bodo preskusne živali zdrave in znanega porekla. Te ribe so na voljo v številnih delih sveta.

▼B

Dodatek 3

Primer krivulje smrtnosti v odvisnosti od koncentracije

Primer določanja LC_{50} z uporabo logaritemskega-verjetnostnega papirja



▼B

C.2 PRESKUS AKUTNE IMOBILIZACIJE VODNIH BOLH (*DAPHNIA* SP.)

1. METODA

Ta preskusna metoda akutne imobilizacije je enakovredna OECD TG 202 (2004).

1.1 UVOD

Ta metoda opisuje preskus akutne toksičnosti za določanje učinkov kemikalij na vodne bolhe. Kolikor je možno, so bile uporabljene obstoječe preskusne metode (1) (2) (3).

1.2 OPREDELITVE POJMOV

V zvezi s to metodo se uporabljajo naslednje opredelitve:

EC_{50}: je koncentracija, za katero se oceni, da imobilizira 50 % vodnih bolh v navedenem obdobju izpostavljenosti. Če se uporabi druga opredelitev pojma, je treba to navesti skupaj z virom.

Imobilizacija: Živali, ki niso zmožne plavati v 15 sekundah po rahlem stresanju preskusne posode, se štejejo za imobilne (čeprav lahko še vedno premikajo svoje tipalke).

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Mlade vodne bolhe, ki niso starejše od 24 ur ob začetku preskusa, se za 48 ur izpostavijo preskusni snovi v nizu koncentracij. Imobilizacija se ugotavlja po 24 urah in 48 urah ter primerja s kontrolnimi vrednostmi. Rezultati se analizirajo, da se izračuna EC_{50} po 48 h (glej oddelek 1.2 za opredelitve). Določevanje EC_{50} po 24 h je izbirno.

1.4 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

Treba je poznati topnost v vodi in parni tlak. na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za številčno vrednotenje snovi v preskusni raztopini z znanim analitskim izkoristkom in mejo zaznavnosti (LOD). Uporabni podatki so strukturna formula, čistost snovi, stabilnost v vodi ali na svetlobi, P_{ow} in rezultati preskusa za dobro biorazgradljivost (glej metodo C.4).

Opomba: Navodila za preskušanje snovi, ki jih je težko preskušati zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti, so na voljo v (4).

1.5 REFERENČNE SNOVI

S preskušanjem referenčne snovi za EC_{50} se zagotavlja zanesljivost preskusnih pogojev. Za ta namen se priporočajo strupene snovi, ki se uporabljajo v mednarodnih preskusih primerljivosti (1) (5) ([1]). Preskus(-e) z referenčno snovjo je najboljše opraviti vsak mesec in najmanj dvakrat letno.

([1]) Rezultati teh medlaboratorijskih preskusov in Tehnični popravek ISO 6341 so za kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$) pokazali EC_{50} – 24 h v območju 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

▼B

1.6 MERILA KAKOVOSTI

Za veljavnost preskusa veljajo naslednja merila izvedbe:

— v kontrolah, vključno s kontrolo, ki vsebuje sredstvo za raztapljanje, ne sme biti imobiliziranih več kot 10 % vodnih bolh,

— koncentracija raztopljenega kisika na koncu preskusa mora biti > 3 mg/l v kontrolni in preskusni posodi.

Opomba: V zvezi s prvim merilom ne sme več kot 10 % kontrolnih vodnih bolh kazati znakov imobilizacije ali drugih znakov bolezni ali stresa, npr. razbarvanja, neobičajnega vedenja, kot je ujetost na površini vode.

1.7 OPIS PRESKUSNE METODE

1.7.1 **Oprema**

Preskusne posode in druge aparature, ki bodo prišle v stik s preskusnimi raztopinami, so v celoti steklene ali iz drugega kemijsko inertnega materiala: Preskusne posode so običajno steklene epruvete ali čaše; pred vsako uporabo jih je treba očistiti s standardnimi laboratorijskimi postopki. Preskusne posode so narahlo pokrite, da se preprečita izguba vode zaradi izhlapevanja in vnos prahu v raztopine. Hlapne snovi je treba preskušati v zaprtih do vrha napolnjenih posodah, ki so dovolj velike, da kisik ne postane omejujoč dejavnik ali da ga je premalo (glej oddelek 1.6 in prvi odstavek oddelka 1.8.3)

Poleg navedenega je potrebna naslednja oprema ali samo del: oksimeter (z mikroelektrodo ali drugo ustrezno opremo za merjenje raztopljenega kisika v majhnih vzorcih); pH-meter; ustrezna aparatura za uravnavanje temperature; oprema za določanje koncentracije skupnega organskega ogljika (TOC); oprema za določanje kemijske potrebe po kisiku (KPK); oprema za določanje trdote vode itn.

1.7.2 **Preskusni organizem**

Prednost ima vrsta *Daphnia magna Straus,* lahko pa se v tem preskusu uporabi tudi druga vrsta (npr. *Daphniapulex).* Preskusne živali morajo biti na začetku preskusa stare manj kot 24 ur; za zmanjšanje variabilnosti se močno priporoča, da niso potomci iz prvega legla. Izvirati morajo iz zdrave populacije (t.j. ne kažejo znakov stresa, kot so visoka smrtnost, navzočnost samcev in ephipije, zakasnitev prvega legla, razbarvane živali itn.). Vsi organizmi, uporabljeni v posameznem preskusu, morajo izvirati iz kultur iz iste populacije vodnih bolh. Zarodne živali je treba držati v razmerah (svetloba, temperatura, medij), ki so podobni tistim iz preskusa. Če se medij za vodne bolhe v preskusu razlikuje od medija za rutinsko gojenje vodnih bolh, je pred preskusom dobro opraviti aklimatizacijo. V tem primeru je treba mladiče vodnih bolh pustiti v vodi za redčenje pri preskusni temperaturi najmanj 48 ur pred začetkom preskusa.

▼B

1.7.3 **Gojiščna voda in voda za redčenje**

Za gojiščno vodo in vodo za redčenje je sprejemljiva naravna voda (površinska ali podzemna voda), obdelana voda ali deklorirana vodovodna voda, če vodne bolhe v njej preživijo trajanje gojitve, aklimatizacije in preskušanja brez znakov stresa. Vsaka voda, ki ustreza kemijskim značilnostim sprejemljive vode za redčenje, ki so navedene v Dodatku 1, je primerna za preskusno vodo. Voda mora biti ves čas trajanja preskusa konstantne kakovosti. Obdelana voda se lahko pripravi z dodajanjem specifičnih količin reagentov priznane analitske čistosti deionizirani ali destilirani vodi. Primeri obdelane vode so prikazani v (1) (6) in Dodatku 2. Upoštevati je treba, da se pri preskušanju snovi, ki vsebujejo kovine, izogibamo medijem, ki vsebujejo znana kelatorska sredstva, kot sta medija M4 in M7 iz Dodatka 2. Vrednost pH mora biti v območju 6 do 9. Za *Daphnia Magna* se priporoča uporaba vode s trdoto med 140 in 250 mg/l (kot $CaCO_3$), za druge vrste vodnih bolh pa so primernejše vode z manjšo trdoto. Vodo za redčenje lahko pred uporabo v preskusu prezračujemo, da koncentracija raztopljenega kisika doseže nasičenost.

Če uporabimo naravno vodo, moramo parametre kakovosti izmeriti najmanj dvakrat letno ali ko posumimo, da so se te značilnosti bistveno spremenile (glej prejšnji odstavek in Dodatek 1). Opraviti je treba tudi meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Če uporabimo deklorirano vodovodno vodo, je zaželeno dnevno analiziranje vsebnosti klora. Če je voda za redčenje površinskega ali podzemnega izvora, moramo izmeriti prevodnost in skupni organski ogljik (TOC) ali kemijsko potrebo po kisiku (KPK).

1.7.4 **Preskusne raztopine**

Preskusne raztopine izbranih koncentracij se ponavadi pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovne raztopine se po možnosti pripravijo z raztapljanjem preskusne snovi v vodi za redčenje. Kolikor je možno, se je treba izogniti uporabi topil, emulgatorjev ali disperzijskih sredstev. Vendar je uporaba teh spojin v nekaterih primerih neizogibna, da pripravimo ustrezno koncentrirano osnovno raztopino. Navodila za primerna topila, emulgatorje in disperzij ska sredstva so v (4). V vsakem primeru preskusna snov v preskusni raztopini ne sme preseči meje topnosti v vodi za redčenje.

Preskus je treba opraviti brez uravnavanja pH. Če pH ne ostane v območju 6–9, se lahko opravi drugi preskus z uravnanjem pH osnovne raztopine na pH vode za redčenje pred dodatkom preskusne snovi. To uravnavanje pH je treba opraviti tako, da se koncentracija v osnovni raztopini ne spremeni bistveno in da se ne povzroči nobena kemijska reakcija ali obarjanje preskusne snovi. Najboljše je uporabiti HCl in NaOH.

▼B

1.8 POSTOPEK

1.8.1 **Pogoji izpostavitve**

1.8.1.1 *Preskusne in kontrolne skupine*

Preskusne posode napolnimo z ustreznimi količinami vode za redčenje in raztopinami preskusne snovi. Razmerje zrak/voda v posodi mora biti enako v preskusni in kontrolni skupini. Vodne bolhe nato vnesemo v preskusne posode. Za vsako preskusno koncentracijo in za kontrole je treba uporabiti najmanj 20 živali, po možnosti razdeljene na štiri skupine po pet živali. Uporabiti je treba najmanj 2 ml preskusne raztopine na žival (t.j. količino 10 ml za pet vodnih bolh v preskusni posodi). Če koncentracija preskusa ni stabilna, se preskus lahko opravi s polstatičnim obnavljanjem ali pretočnim sistemom.

Poleg tretiranega niza se izvede kontrolni niz z vodo za redčenje in če je ustrezno tudi kontrolni niz, ki vsebuje sredstvo za raztapljanje.

1.8.1.2 *Preskusne koncentracije*

Razen če so na voljo podatki o toksičnosti preskusne snovi, se lahko opravi preskus za ugotavljanje območja, namenjen določanju območja koncentracij za dokončni preskus. V ta namen se vodne bolhe izpostavijo nizu s širokimi intervali koncentracij preskusne snovi. Pet vodnih bolh je treba izpostaviti vsaki preskusni koncentraciji 48 ur ali manj. Ponovitve niso obvezne. Obdobje izpostavitve se lahko skrajša (npr. 24 ur ali manj), če je možno pridobiti v krajšem času podatke, primerne namenu preskusa za ugotavljanje območja.

Uporabiti je treba najmanj pet preskusnih koncentracij. Urediti jih je treba v geometrijski vrsti z geometrijskim razmerjem, ki po možnosti ne presega 2,2. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Najvišja preskušena koncentracija po možnosti povzroči 100-odstotno imobilizacijo, najnižja preskušena koncentracija pa nobenih opaznih učinkov.

1.8.1.3 *Pogoji inkubacije*

Temperatura mora biti v območju od 18 °C do 22 °C, vendar konstantna v mejah ± 1 °C pri vsakem preskusu. Priporočljiv je ciklus 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Popolna tema je tudi sprejemljiva, zlasti če so preskusne snovi na svetlobi nestabilne.

Preskusne posode se ne smejo prezračevati med preskusom. Preskus se opravi brez uravnavanja pH. Med preskusom se vodne bolhe ne smejo hraniti.

1.8.1.4 *Trajanje*

Preskus traja 48 ur.

1.8.2 **Pripombe**

V vsaki preskusni posodi se ugotovijo imobilizirane vodne bolhe 24 in 48 ur po začetku preskusa, (glej oddelek 1.2 za opredelitve). Poleg imobiliziranosti se navede tudi vsako neobičajno vedenje ali neobičajni videz.

▼B

1.8.3 **Analitske meritve**

Raztopljeni kisik in pH se izmerita na začetku in koncu preskusa v kontroli(ah) in najvišji koncentraciji preskusne snovi. Koncentracija raztopljenega kisika v kontrolah mora biti skladna s merilom veljavnosti (glej oddelek 1.6). Vrednost pH v posameznem preskusu običajno ne sme variirati za več kot 1,5 enote. Temperatura se običajno meri v kontrolnih posodah ali v zraku prostora in se po možnosti neprekinjeno zapisuje med preskusom ali vsaj na začetku in koncu preskusa.

Koncentracije preskusne snovi je treba izmeriti najmanj v najvišji in najnižji preskusni koncentraciji na začetku in koncu preskusa (4). Priporoča se, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa so na voljo dokazi, da so se koncentracije preskusne snovi zadovoljivo zadrževale v območju ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih.

1.9 MEJNI PRESKUS

Z uporabo postopkov, opisanih v tej metodi, se lahko izvede mejni preskus s 100 mg/l preskusne snovi ali do meje topnosti v preskusnem mediju (pri čemer se uporabi nižja od obeh vrednosti) za dokaz, da je EC_{50} večji od te koncentracije. Mejni preskus je treba izvesti z 20 vodnimi bolhami (po možnosti razdeljenimi v štiri skupine po pet) in enakim številom v kontrolni(-h) skupini(-ah). Če se pojavi imobilizacija, je treba izvesti popolno študijo. Zapisati je treba vsako ugotovljeno neobičajno vedenje.

2. **PODATKI**

Podatke je treba povzeti v preglednici, ki za vsako tretirano skupino in kontrolo prikazuje število uporabljenih vodnih bolh in imobilizacijo pri vsakem opazovanju. Prikaže se odstotek imobiliziranih vodnih bolh po 24 urah in 48 urah glede na preskusne koncentracije. Podatki se analizirajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. verjetnostna analiza itn.), da se izračunajo naklon krivulj in EC_{50} z 9-odstotnimi mejami zaupanja ($p = 0,05$) (7) (8).

Kadar standardne metode izračuna EC_{50} niso primerne za pridobljene podatke, se za približek EC_{50} uporabita najvišja koncentracija, ki ni povzročila imobilizacije, in najnižja koncentracija, ki je povzročila 100-odstotno imobilizacijo (pri čemer je EC_{50} geometrijska sredina teh dveh koncentracij).

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje podatke:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje in pomembne fizikalno-kemijske lastnosti,

▼B

— kemijski identifikacijski podatki, vključno s čistostjo.

Preskusna vrsta:

— izvor in vrsta vodnih bolh *(Daphnia),* izvorni dobavitelj (če je znan) in uporabljeni pogoji gojenja (vključno z izvorom, vrsto in količino hrane, pogostnostjo hranjenja).

Preskusni pogoji:

— opis preskusnih posod: vrsta posod, količina raztopine, število vodnih bolh na preskusno posodo, število preskusnih posod (ponovitev) na koncentracijo,

— metode priprave osnovnih in preskusnih raztopin, vključno z uporabo kakršnih koli topil ali disperzivnih sredstev, uporabljene koncentracije,

— podrobnosti o vodi za redčenje: izvor in kakovostne značilnosti vode (pH, trdota, razmerje Ca/Mg, razmerje Na/K, alkalnost, prevodnost itn); sestava obdelane vode, če je bila uporabljena,

— pogoji inkubacije: temperatura, intenzivnost in periodičnost svetlobe, raztopljeni kisik, pH itn.

Rezultati:

— število in odstotek vodnih bolh, ki so bile imobilizirane ali so kazale kakršne koli škodljive učinke (vključno z neobičajnim vedenjem) v kontrolnih skupinah in vsaki tretirani skupini v vsakem obdobju opazovanja in opis narave opaženih učinkov,

— rezultat in datum opravljenega preskusa z referenčno snovjo, če sta na voljo,

— nominalne preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določevanje koncentracije preskusne snovi v preskusnih posodah; navesti je treba tudi analitski izkoristek metode in mejo zaznavnosti,

— vse fizikalno-kemijske meritve temperature, pH in koncentracije raztopljenega kisika med preskusom,

— EC_{50} po 48 h za imobilizacijo z intervali zaupanja in grafi prirejenih modelov, ki so bili uporabljeni pri izračunu teh vrednosti, nakloni krivulj odmerek-odziv in njihova standardna napaka; statistični postopki, uporabljeni za določevanje EC_{50} (te podatke je treba navesti tudi za imobilizacijo po 24 h, če je bila izmerjena),

— obrazložitev vsakega odstopanja od preskusne metode in morebitni vpliv odstopanja na rezultate preskusa.

4. **VIRI**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Str. 65-84

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

DODATEK 1

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Snov	Koncentracija
Snov v delcih	< 20 mg/l
Skupni organski ogljik	< 2 mg/l
Neionizirani amoniak	< 1 µg/l
Rezidualni klor	< 10 µg/l
Skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Skupni organoklorovi pesticidi s polikloriranimi bifenili	< 50 ng/l
Skupni organski klor	< 25 ng/l

▼B

DODATEK 2

PRIMERI PRIMERNE OBDELANE PRESKUSNE VODE

Preskusna voda ISO (1)

Osnovne raztopine (ena snov)		Za pripravo obdelane vode se doda naslednje količine osnovnih raztopin v 1 litru vode (*)
Snov	Količina dodana v 1 liter vode (*)	
Kalcijev klorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnezijev sulfat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natrijev hidrogenkarbonat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kalijev klorid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Voda primerne čistosti, npr. deionizirana, destilirana ali pridobljena z vzvratno osmozo, ki ne presega 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Medija Elendt M7 in M4

Aklimatizacija na medija Elendt M4 in M7

Nekateri laboratoriji so imeli težave pri neposrednem prenosu vodnih bolh v medija M4 in M7. Vendar so težavo z določenim uspehom rešili s postopno aklimatizacijo, t.j. prenašanjem iz lastnega medija v 30-odsotni medij Elendt, nato v 60-odstotni in nato v 100-odstotni medij Elendt. Aklimatizacijsko obdobje lahko traja do enega meseca.

Priprava

Elementi v sledeh

Ločene osnovne raztopine (I) posameznih elementov v sledeh se najprej pripravijo z vodo primerne čistosti, npr. deionizirano, destilirano ali pridobljeno z vzvratno osmozo. Iz teh različnih osnovnih raztopin (I) se pripravi druga osnovna raztopina (II), ki vsebuje vse elemente v sledeh (kombinirana raztopina), t.j.:

Osnovna(-e) raztopina(-e) I (ena snov)	Količina, dodana vodi (mg/l)	Koncentracija (glede na medij M4)	Za pripravo kombinirane osnovne raztopine II se doda naslednje količine osnovne raztopine I vodi (ml/l)	
			M4	M7
$H_3\ BO_3$	57 190	20 000-kratna	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-kratna	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kratna	1,0	0,25

▼B

Osnovna(-e) raztopina(-e) I (ena snov)	Količina, dodana vodi (mg/l)	Koncentracija (glede na medij M4)	Za pripravo kombinirane osnovne raztopine II se doda naslednje količine osnovne raztopine I vodi (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-kratna	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-kratna	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kratna	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-kratna	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-kratna	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-kratna	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-kratna	1,0	1,0
KI	65	20 000-kratna	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-kratna	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-kratna	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-kratna	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-kratna	—	—

Raztopini Na_2EDTA in $FeSO_4$ se pripravita ločeno, zlijeta skupaj in nato nemudoma avtoklavirata.

Pri tem nastane:

Raztopina 2 l Fe-EDTA		1 000-kratna	20,0	5,0

Medija M4 in M7

Medija M4 in M7 se pripravita iz osnovne raztopine II, makrohranil in vitaminov po naslednjem postopku:

	Količina, dodana vodi (mg/l)	Koncentracija (glede na medij M4)	Količina osnovne raztopine II, dodana za prip ravo medija (ml/l)	
			M4	M7
Osnovna raztopina II (kombinirani elementi v sledeh)		20-kratna	50	50
Osnovne raztopine makrohranil (ena snov)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-kratna	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-kratna	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-kratna	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-kratna	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-kratna	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-kratna	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-kratna	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-kratna	0,1	0,1

▼B

	Količina, dodana vodi (mg/l)	Koncentracija (glede na medij M4)	Količina osnovne raztopine II, dodana za prip ravo medija (ml/l)	
			M4	M7
Kombinirana osnova vitaminov	—	10 000-kratna	0,1	0,1
Kombinirano osnovno raztopino vitaminov pripravimo z dodatkom treh vitaminov v 1 liter vode, kakor je prikazano spodaj:				
Tiamin hidroklorid	750	10 000-kratna		
Cianokobalamin (B_{12})	10	10 000-kratna		
Biotin	7,5	10 000-kratna		

Kombinirano osnovno raztopino vitaminov hranimo zamrznjeno v majhnih alikvotih. Vitamini se dodajo medijem neposredno pred uporabo.

Opomba: Da preprečimo obarjanje soli pri pripravi popolnega medija, dodajamo alikvote osnovnih raztopin v približno 500–800 ml deionizirane vode, ki jo dopolnimo do 1 litra.

Opomba: Prvi opis medija M4 je objavljen v Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

C.3 SLADKOVODNE ALGE IN CIANOBAKTERIJE, PRESKUS ZAVIRANJA RASTI

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 201 (2006; priloga je bila popravljena leta 2011). Ugotovljeno je bilo, da je treba preskusno metodo razširiti, tako da se vanjo vključijo dodatne vrste, in posodobiti, da bo izpolnjevala pogoje za oceno nevarnosti in razvrstitev kemikalij. Te spremembe so bile izvedene na podlagi izčrpnih praktičnih izkušenj, znanstvenega napredka na področju študij strupenosti za alge in ob široki uporabi ustreznih predpisov od njenega prvotnega sprejetja.

2. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

3. Namen tega preskusa je določiti učinke kemikalij na rast sladkovodnih mikroalg in/ali cianobakterij. Preskusni organizmi v eksponentni fazi rasti se v šaržnih kulturah izpostavijo preskusni kemikaliji navadno za 72 ur. Kljub relativno kratkemu trajanju preskusa je mogoče oceniti učinke na več generacijah.

4. Odziv sistema je zmanjšanje rasti pri vrsti kultur alg (preskusnih enot), ki so izpostavljene različnim koncentracijam preskusne kemikalije. Odziv je ocenjen v odvisnosti od koncentracije izpostavljenosti v primerjavi s povprečno rastjo ponovitvenih, neizpostavljenih kontrolnih kultur. Za popolno izražanje odziva sistema na strupene učinke (optimalna občutljivost) se kulturam v zadostnem časovnem obdobju za merjenje zmanjšanja specifične hitrosti rasti omogoči neomejena eksponentna rast pri zadostnih prehranskih pogojih ter stalna svetloba.

5. Rast in zaviranje rasti sta določena z meritvami biomase alg v odvisnosti od časa. Biomasa alg je opredeljena kot suha teža na prostornino, npr. miligram alg na liter preskusne raztopine. Vendar je suho težo težko meriti, zato se uporabljajo nadomestni parametri. Od teh nadomestkov se najpogosteje uporablja število celic. Drugi nadomestni parametri vključujejo prostornino celic, fluorescenco, optično gostoto itd. Pretvorni faktor med izmerjenim nadomestnim parametrom in biomaso mora biti znan.

6. Končna točka preskusa je zaviranje rasti, izraženo kot logaritemsko povečanje biomase (povprečne specifične hitrosti rasti) med obdobjem izpostavljenosti. Iz povprečnih specifičnih hitrosti rasti, zabeleženih v nizu preskusnih raztopin, se določi koncentracija, ki je povzročila navedeno x-odstotno zaviranje hitrosti rasti (npr. 50-odstotno); ta koncentracija se izrazi kot E_rC_x (npr. E_rC_{50}).

7. Dodatna spremenljivka odziva, ki se uporablja v tej preskusni metodi, je prirast, ki jo je morda treba določiti, da se izpolnijo specifične zakonske zahteve nekaterih držav. Opredeljena je kot biomasa na koncu obdobja izpostavljenosti, od katere je odšteta biomasa na začetku obdobja izpostavljenosti. Iz prirasti, zabeležene v nizu preskusnih raztopin, se določi koncentracija, ki je povzročila navedeno x-odstotno zaviranje prirasti (npr. 50-odstotno), ta koncentracija se izrazi kot E_yC_x (npr. E_yC_{50}).

8. Poleg navedenega se lahko statistično določita tudi najnižja koncentracija z opaznim učinkom (LOEC) in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC).

▼M6

PODATKI O PRESKUSNI KEMIKALIJI

9. Podatki o preskusni kemikaliji, ki so lahko uporabni pri vzpostavitvi preskusnih pogojev, vključujejo strukturno formulo, stopnjo čistosti, stabilnost na svetlobi, stabilnost v pogojih preskusa, lastnosti absorpcije svetlobe, pKa in rezultate študij o preoblikovanju, vključno z biološko razgradljivostjo v vodi.

10. Topnost v vodi, porazdelitveni koeficient oktanol/voda (P_{ow}) in parni tlak preskusne kemikalije morajo biti znani, razpoložljiva pa mora biti tudi validirana metoda za kvantifikacijo kemikalije v preskusnih raztopinah skupaj z navedeno rekuperacijo in mejo zaznavnosti.

VELJAVNOST PRESKUSA

11. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjena naslednja izvedbena merila:

— Biomasa v kontrolnih kulturah se mora v 72 urah preskusnega obdobja eksponentno povečati najmanj za faktor 16. To ustreza specifični hitrosti rasti v 0,92 dan^{-1}. Za najpogosteje uporabljene vrste je hitrost rasti navadno bistveno višja (glej Dodatek 2). Merilo morda ne bo izpolnjeno, kadar se uporabijo vrste, ki rastejo počasneje od tistih, ki so navedene v Dodatku 2. V tem primeru se mora preskusno obdobje podaljšati, da se zagotovi 16-kratna rast v kontrolnih kulturah, medtem ko mora biti rast eksponentna skozi celotno preskusno obdobje. Preskusno obdobje se lahko skrajša na najmanj 48 ur, da se ohrani neomejena eksponentna rast med preskusom, pod pogojem, da je dosežen minimalni faktor pomnoževanja 16.

— Srednji koeficient variacije za posamične specifične hitrosti rasti (dnevi 0–1, 1–2 in 2–3, za 72-urne preskuse) v kontrolnih kulturah (glej „koeficient variacije“ v Dodatku 1) ne sme prekoračiti 35 %. Za računanje posamičnih specifičnih hitrosti rasti glej odstavek 49. Merilo se uporablja za srednjo vrednost koeficientov variacije, izračunanih za ponovitvene kontrolne kulture.

— Koeficient variacije za povprečne specifične hitrosti rasti med celotnim preskusnim obdobjem v ponovitvenih kontrolnih kulturah ne sme prekoračiti 7 % v preskusih z zelenimi algami *Pseudokirchneriella subcapitata* in *Desmodesmus subspicatus*. Za druge manj pogosto preskušane vrste vrednost ne sme prekoračiti 10 %.

REFERENČNA KEMIKALIJA

12. Referenčne kemikalije, kot je na primer 3,5-diklorofenol, ki se uporablja za mednarodni krožni preskus (1), se lahko preskušajo z namenom preverjanja preskusnega postopka. Kot referenčna kemikalija za zelene alge se prav tako lahko uporabi kalijev dikromat. Referenčno kemikalijo je zaželeno preskusiti vsaj dvakrat letno.

UPORABNOST PRESKUSA

13. Ta preskusna metoda se najlažje uporabi pri vodotopnih kemikalijah, za katere je verjetno, da bodo v pogojih preskusa ostale v vodi. Za preskušanje kemikalij, ki so hlapne, močno adsorptivne, obarvane in slabo topne v vodi,

▼M6

ali kemikalij, ki lahko vplivajo na razpoložljivost hranilnih snovi ali mineralov v preskusnem mediju, so morda potrebne nekatere prilagoditve opisanega postopka (npr. zaprt sistem ali kondicioniranje preskusnih posod). Navodila za nekaj primernih prilagoditev so navedena v (2), (3) in (4).

OPIS PRESKUSNE METODE

Naprava

14. Preskusne posode in druge naprave, ki pridejo v stik s preskusnimi raztopinami, morajo biti v celoti iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Predmete je treba temeljito umiti, da organska ali anorganska onesnaževala ne ovirajo rasti alg ali sestave preskusnih raztopin.

15. Preskusne posode so navadno steklene bučke z dimenzijami, ki dopuščajo zadostno prostornino kulture za meritve med preskusom in zadosten prenos mase CO_2 iz ozračja (glej odstavek 30). Količina tekočine mora biti zadostna za analitsko določanje (glej odstavek 37).

16. Morda bo potrebna tudi nekatera ali vsa oprema v nadaljevanju:

— Inkubator za kultiviranje: priporočena je omara ali soba, v kateri se lahko izbrana temperatura inkubacije vzdržuje na ± 2 °C.

— Naprave za merjenje svetlobe: treba je poudariti, da lahko metoda za merjenje obsevanosti in še zlasti vrsta sprejemnika (odjemnika) vpliva na izmerjeno vrednost. Meritve naj se po možnosti izvajajo z uporabo okroglega (4 π) sprejemnika (ki reagira na neposredno in odbito svetlobo iz vseh kotov nad in pod ravnino meritve) ali sprejemnika 2 π (ki reagira na svetlobo iz vseh kotov nad ravnino meritve).

— Naprava za določanje biomase alg. Število celic, ki je najpogosteje uporabljen nadomestni parameter za biomaso alg, se lahko pridobi z uporabo elektronskega števca delcev, mikroskopa s števno komoro ali pretočnega citometra. Za merjenje drugih nadomestkov biomase je mogoče uporabiti pretočni citometer, fluorimeter, spektrofotometer ali kolorimeter. Pretvorni faktor, ki povezuje število celic s suho težo, je koristen za preračunavanje. Za zagotovitev uporabnih meritev pri nizkih koncentracijah biomase, ko se uporablja spektrofotometer, bo morda treba uporabiti kivete s svetlobno potjo vsaj 4 cm.

Preskusni organizmi

17. Uporabi se lahko nekaj vrst nepritrjenih mikroalg in cianobakterij. Sevi, navedeni v Dodatku 2, so se izkazali kot primerni za uporabo preskusnega postopka, določenega v tej preskusni metodi.

18. Pri uporabi drugih vrst je treba poročati o sevu in/ali izvoru. Treba je potrditi, da se lahko eksponentna rast izbrane preskusne alge ohrani skozi celotno preskusno obdobje pri prevladujočih pogojih.

Gojišče

19. Priporočata se dve alternativni gojišči; gojišče OECD in gojišče AAP. Sestavi teh gojišč sta prikazani v Dodatku 3. Začetna vrednost pH in kapaciteta pufrov (ki ureja porast pH) sta v teh dveh gojiščih različni. Zato so rezultati preskusov lahko različni, odvisno od uporabljenega gojišča, zlasti pri preskušanju ionizirajočih kemikalij.

▼M6

20. Morda bo za nekatere namene, npr. pri preskušanju kovin in kelatnih reagentov ali pri preskušanju pri različnih vrednostih pH, treba prilagoditi gojišče. Uporaba prilagojenega gojišča mora biti podrobno opisana in utemeljena (3)(4).

Začetna koncentracija biomase

21. Začetna biomasa v preskusnih kulturah mora biti enaka v vseh preskusnih kulturah in zadostno nizka, da dopušča eksponentno rast skozi celotno inkubacijsko obdobje brez tveganja izčrpanja hranilnih snovi. Začetna biomasa kot suha teža ne sme prekoračiti 0,5 mg/l. Priporočene so naslednje začetne koncentracije celic:

Pseudokirchneriella subcapitata	$5 \times 10^3 - 10^4$ celic/ml
Desmodesmus subspicatus	$2 - 5 \times 10^3$ celic/ml
Navicula pelliculosa	10^4 celic/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 celic/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ celic/ml

Koncentracija preskusne kemikalije

22. Razpon koncentracije, v katerem se lahko pojavijo učinki, je lahko določen na osnovi rezultatov iz preskusov za določanje območja delovanja. Za zadnji dokončni preskus naj se izbere najmanj pet koncentracij, razvrščenih v geometrijski vrsti s faktorjem, ki ne presega 3,2. Za preskusno kemikalijo, ki kaže ravno krivuljo odziva na koncentracijo, je lahko določen višji faktor. Serije koncentracij naj po možnosti pokrivajo razpon, ki povzroča 5–75-odstotno zaviranje hitrosti rasti alg.

Ponovitve in kontrole

23. Načrt preskusa mora vključevati tri ponovitve za vsako preskusno koncentracijo. Če ni zahtevana določitev NOEC, se lahko načrt preskusa prilagodi, da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovitev na koncentracijo. Izvedejo se najmanj tri kontrolne ponovitve, v idealnih razmerah pa naj se uporabi dvakratno število ponovitev za vsako preskusno koncentracijo.

24. Za analitsko določanje koncentracij preskusne kemikalije se lahko pripravi ločena serija preskusnih raztopin (glej odstavka 36 in 38).

25. Kadar se za raztapljanje preskusne kemikalije uporabi topilo, morajo biti v načrt preskusa vključene dodatne kontrolne kulture, ki vsebujejo topilo v enaki koncentraciji, kot je bila uporabljena pri preskusnih kulturah.

Priprava kulture inokuluma

26. Kultura inokuluma se pripravi v preskusnem mediju 2–4 dni pred začetkom preskusa zaradi prilagoditve preskusnih alg preskusnim pogojem in zagotovitve, da so alge v fazi eksponentne rasti, ko se uporabijo za inokulacijo preskusnih raztopin. Biomaso alg je treba prilagoditi, da lahko eksponentna rast do začetka preskusa prevlada v kulturi inokuluma. Kultura inokuluma se inkubira pri enakih pogojih kot preskusne kulture. V kulturi inokuluma se

▼M6

meri porast biomase, da se zagotovi rast znotraj normalnega obsega za preskusni sev v pogojih kultiviranja. Primer postopka za kultiviranje alg je opisan v Dodatku 4. Da ne pride do sinhrone delitve celic med preskusom, se lahko zahteva še drugi korak razmnoževanja kulture inokuluma.

Priprava preskusnih raztopin

27. Vse preskusne raztopine morajo vsebovati enake koncentracije gojišč in začetno biomaso preskusnih alg. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se navadno pripravijo z mešanjem založne raztopine preskusne kemikalije z gojiščem in kulturo inokuluma. Založne raztopine se navadno pripravijo tako, da se kemikalija raztopi v preskusnem mediju.

28. Topila, npr. aceton, t-butil alkohol in dimetilformamid, je mogoče uporabljati kot nosilce za dodajanje kemikalij z nizko topnostjo v vodi preskusnemu mediju (2)(3). Koncentracija topila naj ne prekorači 100 µl/l in enaka koncentracija topila naj bo dodana vsem kulturam (tudi kontrolnim) v preskusni seriji.

Inkubacija

29. Preskusne posode se zaprejo z zamaški, ki prepuščajo zrak. Posode se pretresejo in postavijo v inkubator za kultiviranje. Med preskusom je treba imeti alge v suspenziji in omogočiti prenos CO_2. V ta namen je potrebno nenehno tresenje ali mešanje. Kulture naj se ohranjajo pri temperaturi med 21 in 24 °C, kontrolirani pri ± 2 °C. Za vrste, ki niso naštete v Dodatku 2, npr. tropske, so lahko primerne višje temperature, pod pogojem, da je mogoče izpolniti merila za veljavnost. Priporočeno je, da se bučke v inkubatorju naključno razporedijo in dnevno prestavljajo.

30. Vrednost pH kontrolnega medija se med preskusom ne bi smela povečati za več kot 1,5 enote. Za kovine in spojine, ki delno ionizirajo pri vrednosti pH, približno enaki preskusni vrednosti pH, je morda treba omejiti premik (drift) pH, da se zagotovijo ponovljivi in natančni rezultati. Premik za < 0,5 enote pH je tehnično izvedljiv in ga je mogoče doseči tako, da se v preskusni raztopini zagotovi primerna stopnja prenosa mase CO_2 iz okoliškega zraka, npr. s povečanjem stopnje tresenja. Druga možnost je zmanjšanje potrebe po CO_2 z zmanjšanjem začetne biomase ali skrajšanjem trajanja preskusa.

31. Površina, na kateri so kulture inkubirane, naj prejema stalno, enotno fluorescentno osvetljenost, npr. „hladno belo“ svetlobo ali „dnevno svetlobo“. Sevi alg in cianobakterij se razlikujejo glede svojih zahtev po svetlobi. Izbrana obsevanost naj ustreza uporabljenemu preskusnemu organizmu. Za priporočene vrste zelenih alg izberite obsevanost na stopnji preskusnih raztopin v območju 60–120 $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$, kadar se z uporabo primernega sprejemnika meri v fotosintetično učinkovitem obsegu valovne dolžine 400–700 nm. Nekatere vrste, zlasti *Anabaena flos-aquae*, dobro rastejo pri nižjih obsevanostih in se pri visokih obsevanostih lahko poškodujejo. Za takšne vrste naj bo izbrana povprečna obsevanost v območju 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Pri merilnikih svetlobe, umerjenih v luksih, enakovredno območje 4 440–8 880 luksov za hladno belo svetlobo približno ustreza priporočeni obsevanosti 60– 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). V inkubacijskem območju vzdržujte obsevanost v razponu ± 15 % povprečne obsevanosti.

▼M6

Trajanje preskusa

32. Preskus navadno traja 72 ur. Lahko traja tudi več ali manj časa, pod pogojem da so izpolnjena vsa merila za veljavnost, navedena v odstavku 11.

Meritve in analitske določitve

33. Biomasa alg v vsaki bučki se med preskusnim obdobjem določa najmanj enkrat dnevno. Če se merjenje izvaja na majhnih količinah, vzetih iz preskusne raztopine s pipeto, je treba te ohranjati nespremenjene.

34. Merjenje biomase se izvaja z ročnim štetjem celic s pomočjo mikroskopa ali z elektronskim števcem delcev (s štetjem celic in/ali biovolumnom). Alternativne tehnike, npr. pretočno citometrijo, klorofilno fluorescenco *in vitro* ali *in vivo* (5)(6) ali optično gostoto, se lahko uporabijo, če je mogoče v območju biomase v preskusu ugotoviti zadovoljivo povezavo z biomaso.

35. Vrednost pH raztopin se izmeri na začetku in koncu preskusa.

36. Če je na voljo analitski postopek za določanje preskusne kemikalije v uporabljenem razponu koncentracije, je treba preskusne raztopine analizirati, da se preverijo začetne koncentracije in vzdrževanje koncentracij izpostavljenosti med preskusom.

37. Analiza koncentracije preskusne kemikalije na začetku in koncu preskusa nizke in visoke preskusne koncentracije ter koncentracija okrog pričakovane EC_{50} lahko zadoščata, če je verjetno, da se bodo koncentracije izpostavljenosti med preskusom od nominalnih vrednosti razlikovale za manj kot 20 %. Analiza vseh preskusnih koncentracij na začetku in koncu preskusa je priporočljiva, če je malo verjetno, da bodo koncentracije ostale znotraj območja 80– 120 % nominalne koncentracije. Za hlapne, neobstojne ali močno adsorptivne preskusne kemikalije se med obdobjem izpostavljenosti priporoča dodatno vzorčenje za analizo v 24-urnih intervalih, da se bolje določijo izgube preskusne kemikalije. Za te kemikalije so morda potrebne posebne ponovitve. V vseh primerih je treba izvesti določanje koncentracije preskusne kemikalije samo na eni ponovitveni posodi pri vsaki preskusni koncentraciji (ali vsebinah posod, zbranih s ponovitvijo).

38. Preskusno gojišče, pripravljeno posebej za analizo koncentracij izpostavljenosti med preskusom, naj se obravnava enako kot tisto, uporabljeno za preskušanje; npr. naj se inokulira z algami in inkubira pri enakih pogojih. Če je zahtevana analiza raztopljene koncentracije preskusne kemikalije, je morda treba ločiti alge od gojišča. Najbolje je, da se ločitev izvede s centrifugiranjem z nizkim pospeškom g, ki zadošča, da se alge usedejo.

39. Če so na voljo dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije zadovoljivo vzdrževale v območju ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ves čas preskusa, lahko analiza rezultatov temelji na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih. Če odklon od nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ni v območju ± 20 %, se analiza rezultatov utemelji na geometrijski srednji koncentraciji med izpostavljenostjo ali na modelih, ki opisujejo upad koncentracije preskusne kemikalije (3)(7).

▼M6

40. Preskus zaviranja rasti alge je bolj dinamičen preskusni sistem od večine drugih kratkoročnih preskusov strupenosti za vodno okolje. Posledično je morda težko določiti dejanske koncentracije izpostavljenosti, zlasti za adsorptivne kemikalije, preskušane pri nizkih koncentracijah. Izginevanje preskusne kemikalije iz raztopine z adsorpcijo v naraščajočo biomaso alg v takih primerih ne pomeni, da se je kemikalija izgubila iz preskusnega sistema. Ko je rezultat preskusa analiziran, je treba preveriti, ali upadanje koncentracije preskusne kemikalije med preskusom spremlja upadanje v zaviranju rasti. Če je tako, se lahko prouči uporaba primernega modela, ki opisuje upadanje koncentracije preskusne kemikalije (7). Če ne, je morda primerno utemeljiti analizo rezultatov na začetnih (nominalnih ali izmerjenih) koncentracijah.

Druga opazovanja

41. Izvesti je treba mikroskopsko opazovanje, da se preveri normalna in zdrava navzočnost kulture inokuluma in opazi vsako nenormalno pojavljanje alg (ki ga lahko povzroči izpostavljenost preskusni kemikaliji) na koncu preskusa.

Mejni preskus

42. V nekaterih okoliščinah, npr. kadar predhodni preskus pokaže, da preskusna kemikalija nima strupenih učinkov pri koncentracijah do 100 mg/l ali do svoje meje topnosti v preskusnem mediju (kar je nižje), se lahko izvede mejni preskus, ki vključuje primerjavo odzivov v kontrolni skupini in eni tretirani skupini (100 mg/l ali koncentracija, ki je enaka meji topnosti). Zelo se priporoča, da se ta preskus podpre z analizo koncentracije izpostavljenosti. Za mejni preskus se uporabljajo vsi prej opisani preskusni pogoji in merila za veljavnost, razen da je število tretiranih ponovitev najmanj šest. Spremenljivke odziva v kontrolni in tretirani skupini se lahko analizirajo z uporabo statističnega preskusa za primerjavo sredin, npr. s t-preskusom. Če so variance obeh skupin neenake, je treba izvesti t-preskus, prilagojen za neenake variance.

PODATKI IN POROČANJE

Izris rastnih krivulj

43. Biomasa v preskusnih posodah je lahko izražena v enotah nadomestnega parametra, uporabljenega za merjenje (npr. število celic, fluorescenca).

44. V preglednici se predstavi ocenjena koncentracija biomase v preskusnih kulturah in kontrolnih skupinah skupaj s koncentracijami preskusnega materiala in časom meritev, zabeleženim z ločljivostjo vsaj celih ur, da se izdela izris rastnih krivulj. V tej fazi so lahko uporabne tako logaritemske kot linearne lestvice, vendar so logaritemske lestvice obvezne in na splošno podajo boljšo predstavitev variacij rastnega vzorca med preskusnim obdobjem. Eksponentna rast pri izrisu na logaritemski lestvici kaže ravno črto in naklon (nagib) črte prikazuje specifično hitrost rasti.

45. Z uporabo izrisov se preveri, ali kontrolne kulture skozi celotni preskus rastejo eksponentno in s pričakovano hitrostjo. Zaradi možnih napak se preverijo vse podatkovne točke in videz krivulj ter neobdelani podatki in postopki. Zlasti se preverijo vse podatkovne točke, za katere se zdi, da odstopajo zaradi sistematične napake. Če je mogoče postopkovne napake očitno prepoznati in/ali so zelo verjetne, se specifična podatkovna točka označi kot osamelec in se ne vključi v kasnejšo statistično analizo. (Koncentracija alg nič v eni od dveh ali treh ponovitvenih posod lahko pokaže, da

▼M6

posoda ni bila pravilno inokulirana ali da je bila neprimerno očiščena.) Razlogi za zavrnitev podatkovnih točk kot osamelcev morajo biti jasno navedeni v poročilu o preskusu. Veljavni razlogi so samo (redko) postopkovne napake, ne pa nenatančnost. Statistični postopki za prepoznavanje osamelcev imajo za to vrsto problema omejeno uporabnost in ne morejo nadomestiti strokovne presoje. Osamelci (označeni kot taki) naj se po možnosti ohranijo med podatkovnimi točkami, ki so prikazane v katerikoli grafični ali tabelarni predstavitvi podatkov.

Spremenljivke odziva

46. Namen preskusa je določiti učinke preskusne kemikalije na rast alg. Ta preskusna metoda opisuje dve spremenljivki odziva, saj imajo države članice različne preference in zakonske zahteve. Da bi bili rezultati preskusa sprejemljivi v vseh državah članicah, se morajo učinki ovrednotiti z obema spremenljivkama odziva, (a) in (b), ki sta opisani spodaj.

(a) Povprečna specifična hitrost rasti: ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi logaritemskega naraščanja biomase med preskusnim obdobjem, ki je izraženo dnevno.

(b) Prirast: ta spremenljivka odziva je biomasa na koncu preskusa, od katere je odšteta začetna biomasa.

47. Opozoriti je treba, da vrednosti strupenosti, ki se izračunajo iz teh dveh spremenljivk odziva, niso primerljive. To razliko je treba upoštevati pri uporabi rezultatov preskusa. Če se upoštevajo pogoji preskusa iz te preskusne metode, bodo vrednosti EC_x, ki temeljijo na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x), navadno višje od rezultatov, ki temeljijo na prirasti (E_yC_x), zaradi matematične osnove teh dveh pristopov. To se ne sme razlagati kot razlika v občutljivosti obeh spremenljivk odziva. Razlika enostavno izvira iz različne matematične narave vrednosti. Pojem povprečne specifične hitrosti rasti temelji na splošnem vzorcu eksponentne rasti alg v nelimitiranih kulturah, ko se strupenost ocenjuje na osnovi učinkov na hitrost rasti brez odvisnosti od absolutne ravni specifične hitrosti rasti v kontrolnem vzorcu, naklona krivulje koncentracija-odziv ali od trajanja preskusa. Nasprotno pa so rezultati, ki temeljijo na prirasti kot spremenljivki odziva, odvisni od vseh teh drugih spremenljivk. E_yC_x je odvisna od specifične hitrosti rasti vrst alg, uporabljenih v vsakem preskusu, in od maksimalne specifične hitrosti rasti, ki je lahko različna glede na vrsto in celo glede na seve alg. Ta spremenljivka odziva se ne uporablja za primerjanje občutljivosti na strupene snovi med vrstami alg ali celo različnimi sevi. Z znanstvenega vidika ima uporaba povprečne specifične hitrosti rasti prednost pri ocenjevanju strupenosti, vendar so ocene strupenosti na osnovi prirasti vključene v to preskusno metodo, da se izpolnijo trenutne zakonske zahteve nekaterih držav.

Povprečna hitrost rasti

48. Povprečna specifična hitrost rasti za določeno obdobje se izračuna kot logaritemsko povečanje biomase za vsako posamezno posodo kontrolnih in tretiranih skupin iz enačbe [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dan}^{-1}) \qquad [1],$$

pri čemer je:

μ_{i-j} povprečna specifična hitrost rasti od časa i do j,

X_i biomasa v času i,

X_j biomasa v času j.

Srednja vrednost hitrosti rasti skupaj z ocenami razhajanj se izračuna za vsako tretirano in kontrolno skupino.

49. Povprečna specifična hitrost rasti se izračuna za celotno preskusno obdobje (navadno dnevi 0–3) z uporabo nominalno inokulirane biomase kot začetne vrednosti in ne izmerjene začetne vrednosti, saj je v tem primeru dosežena večja natančnost. Če oprema za merjenje biomase dopušča zadovoljivo natančno določanje nizke biomase inokuluma (npr. pretočni citometer), potem se lahko uporabi začetna izmerjena koncentracija biomase. Prav tako se ocenijo posamične hitrosti rasti, izračunane kot specifične hitrosti rasti za vsak dan med potekom preskusa (dneve 0– 1, 1–2 in 2–3) in pregleda se, ali kontrolna hitrost rasti ostaja konstantna (glej merila za veljavnost, odstavek 11). Od celotne povprečne specifične hitrosti rasti znatno nižja specifična hitrost rasti prvega dne lahko nakazuje lag fazo (fazo prilagajanja). Medtem ko je lahko lag faza v kontrolnih skupinah s pravilnim razmnoževanjem predkultur zmanjšana in praktično izničena, lahko lag faza v izpostavljenih kulturah nakazuje obnovitev po začetnem toksičnem stresu ali zmanjšani izpostavljenosti zaradi izgube preskusne kemikalije (vključno s sorpcijo na biomaso alg) po začetni izpostavljenosti. Zaradi tega se lahko oceni posamična hitrost rasti, da se ocenijo učinki preskusne kemikalije, ki se pojavijo med obdobjem izpostavljenosti. Znatne razlike med presečno hitrostjo rasti in povprečno hitrostjo rasti kažejo odklon od konstantne eksponentne rasti in da je utemeljeno natančno preverjanje rastnih krivulj.

50. Odstotek zaviranja hitrosti rasti za vsako tretirano ponovitev se izračuna po enačbi [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

pri čemer je:

$\%I_r$ = odstotek zaviranja povprečne specifične hitrosti rasti,

μ_C = srednja vrednost za povprečno specifično hitrost rasti (μ) v kontrolni skupini,

μ_T = povprečna specifična hitrost rasti za tretirano ponovitev.

51. Če se za pripravo preskusnih raztopin uporabijo topila, naj se pri izračunu odstotka zaviranja namesto kontrol brez topil uporabi kontrole s topilom.

Prirast

52. Prirast se računa kot biomasa ob koncu preskusa, od katere je odšteta začetna biomasa za vsako posodo kontrolnega in tretiranega vzorca. Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolno skupino se izračuna srednja vrednost prirasti in oceni varianca. Odstotek zaviranja prirasti (% I_y) se lahko izračuna za vsako tretirano ponovitev po enačbi:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

pri čemer je:

$\%\ I_y$ = odstotek zaviranja prirasti,

Y_C = srednja vrednost prirasti v kontrolni skupini,

Y_T = vrednost prirasti za tretirano ponovitev.

Izris krivulje koncentracija-odziv

53. Izriše se odstotek zaviranja glede na logaritem koncentracije preskusne kemikalije in se natančno pregleda izris, pri čemer se ne upošteva vsaka takšna podatkovna točka, ki je bila kot osamelec izločena v prvi fazi. Skozi podatkovne točke se potegne ravna črta, in sicer ročno ali z računalniško interpolacijo, da se dobi prvi vtis o razmerju koncentracija-odziv, nato pa se nadaljuje z bolj podrobno metodo, po možnosti z računalniško statistično metodo. Odvisno od predvidene uporabe podatkov, kakovosti (natančnosti) in količine podatkov ter razpoložljivosti orodij za analizo podatkov se je mogoče odločiti (in včasih povsem upravičeno), da se ustavi analiza podatkov na tej stopnji in se preprosto preberejo ključne vrednosti EC_{50} in EC_{10} (in/ali EC_{20}) iz ročno narisane krivulje (glej tudi spodnji oddelek o spodbujevalnih učinkih). Utemeljeni razlogi za neuporabo statistične metode lahko vključujejo naslednje:

— podatki niso primerni za računalniške metode, saj le-te ne izdelajo nobenih bolj zanesljivih rezultatov, kot jih lahko pridobi strokovna presoja – nekateri računalniški programi v takšnih situacijah celo ne morejo izdelati zanesljive rešitve (ponovitve se ne združujejo itd.);

— spodbujevalni odzivi rasti se z uporabo razpoložljivih računalniških programov ne morejo ustrezno obravnavati (glej spodaj).

Statistični postopki

54. Cilj je količinsko ovrednotiti odziv na koncentracijo z regresijsko analizo. Lahko se uporabi tehtana linearna regresija, po tem ko se izvede linearizacijska pretvorba podatkov o odzivu – na primer v verjetnostnih ali logističnih ali Weibullovih enotah (8), vendar so nelinearni regresijski postopki prednostne metode, ki bolje obravnavajo neizogibne podatkovne nepravilnosti in odklone od enakomerne porazdelitve. Če se te nepravilnosti približujejo ničelnemu ali popolnemu zaviranju, se lahko s pretvorbo povečajo in ovirajo analizo (8). Upoštevati je treba, da so standardne metode za analizo, ki uporabljajo analize probit, analize logit ali Weibullove pretvorbe, namenjene za uporabo na kvantiziranih podatkih (npr. umrljivost ali preživetje) in morajo biti ustrezno prirejene zaradi upoštevanja podatkov o rasti ali o biomasi. Specifični postopki za določevanje vrednosti EC_x iz kontinuiranih podatkov so na voljo v (9), (10) in (11). Uporaba nelinearne regresijske analize je podrobneje opisana v Dodatku 5.

55. Za vsako analizirano spremenljivko odziva se izračuna točkovna ocena vrednosti EC_x, pri čemer se uporabi razmerje med odzivom in koncentracijo. Kadar je to mogoče, se za vsako oceno določi 95-odstotne meje zaupanja. Grafično ali statistično je treba določiti ustreznost prileganja podatkov odziva na regresijski model. Regresijska analiza se mora opraviti na odzivih posameznih ponovitev in ne na srednjih vrednostih tretiranih skupin. Če pa je nelinearno prilagajanje krivulj težavno ali zaradi preveč razpršenih podatkov ne uspe, se težavo lahko zaobide z izvedbo regresije na skupinskih

▼M6

srednjih vrednostih kot praktičnim načinom zmanjševanja vpliva pričakovanih osamelcev. Uporaba te možnosti naj se navede v poročilu kot odmik od normalnega postopka, ker ujemanje krivulje s posamičnimi ponovitvami ni dalo dobrih rezultatov.

56. Ocene EC_{50} in meje zaupanja se prav tako lahko pridobi z uporabo linearne interpolacije z metodo vezanja (13), če so razpoložljivi regresijski modeli/metode za podatke neustrezni.

57. Za ocenjevanje LOEC in zato tudi NOEC za učinke preskusne kemikalije na hitrost rasti je treba primerjati srednje vrednosti tretiranih skupin z uporabo tehnik analize variance (ANOVA). Srednja vrednost za vsako koncentracijo se nato primerja s srednjo vrednostjo kontrole z ustrezno metodo večkratne primerjave ali trendnostnega preskusa. Uporabna sta lahko Dunnettov ali Williamsov preskus (12)(14)(15)(16)(17). Treba je ugotoviti, ali velja domneva homogenosti variance v analizi variance. Ta ocena se lahko izvede grafično ali s formalnim preskusom (17). Primerna preskusa sta preskus po Levenu ali preskus po Bartlettu. Če domneva homogenosti variance ni izpolnjena, lahko to odpravimo z logaritemsko pretvorbo podatkov. Če je heterogenost variance skrajna in je ni mogoče odpraviti s pretvorbo, je treba proučiti možnosti analize z metodami, kot so večstopenjski trendnostni preskusi po Jonkheeru. Dodatna navodila o določanju NOEC so navedena v (11).

58. Nedavni razvoj znanosti je privedel do priporočila o opuščanju koncepta NOEC in njegovi zamenjavi z regresijsko določenimi točkovnimi ocenami EC_x. Za ta preskus alg ni bila določena primerna vrednost x. Primerno je območje od 10 do 20 % (odvisno od izbrane spremenljivke odziva) in po možnosti naj se poroča tako o EC_{10} kot tudi o EC_{20}.

Spodbujanje rasti

59. Pri nizkih koncentracijah je včasih opaženo spodbujanje rasti (negativno zaviranje). To je lahko posledica hormeze („spodbujevalni učinek strupenosti“) ali dodajanja spodbujevalnih rastnih faktorjev s preskusnim materialom minimalnemu uporabljenemu gojišču. Upoštevati je treba, da naj dodajanje anorganskih hranil ne bi imelo nobenih neposrednih učinkov, saj naj bi preskusni medij ohranjal presežek hranil skozi celoten preskus. Nizek odmerek spodbujanja se navadno ne upošteva pri računanju EC_{50}, razen če je zelo velik. Če pa je zelo velik ali če se izračuna vrednost EC_x za nizek x, so potrebni posebni postopki. Brisanju spodbujevalnih odzivov iz analize podatkov se je treba izogibati, če je mogoče; če razpoložljiva programska oprema za prilagajanje krivulje ne more sprejeti manjših spodbujanj, je mogoče uporabiti linearno interpolacijo z metodo vezanja. Če je spodbujanje zelo veliko, naj se obravnava model hormeze (18).

Nestrupeno zaviranje rasti

60. Preskusni materiali, ki absorbirajo svetlobo, lahko povzročijo zmanjšanje hitrosti rasti, ker senčenje zmanjša količino razpoložljive svetlobe. Takšne fizikalne učinke je treba s prilagoditvijo preskusnih pogojev ločiti od strupenih učinkov in o njih ločeno poročati. Navodila so navedena v (2) in (3).

POROČILO O PRESKUSU

61. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

▼**M6**

Preskusna kemikalija:

— fizične značilnosti in fizikalno-kemijske lastnosti, vključno z mejo topnosti v vodi,

— kemijski identifikacijski podatki (npr. številka CAS), vključno s čistostjo (nečistote).

Preskusne vrste:

— sev, dobavitelj ali vir in uporabljeni pogoji gojenja.

Preskusni pogoji:

— datum začetka preskusa in njegovo trajanje,

— opis načrta preskusa: preskusnih posod, volumnov kultur, gostote biomase na začetku preskusa,

— sestava medija,

— preskusne koncentracije in ponovitve (npr. število ponovitev, število uporabljenih preskusnih koncentracij in geometrijskih naraščanj),

— opis priprave preskusnih raztopin, vključno z uporabo topil itd.,

— inkubator za kultiviranje,

— obsevanost in kakovost svetlobe (vir, homogenost),

— temperatura,

— preskušene koncentracije: nominalne preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določevanje koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah. Poroča naj se o analitskem izkoristku metode in meji določanja v preskusni matrici,

— vsi odkloni od te preskusne metode,

— metoda za določanje biomase in dokazi o korelaciji med izmerjenim parametrom in suho težo.

Rezultati:

— vrednosti pH na začetku in koncu preskusa za vsa tretiranja,

— biomasa za vsako bučko pri vsaki točki meritve in metoda za merjenje biomase,

— rastne krivulje (izris biomase glede na čas),

— izračunane spremenljivke odziva za vsako tretirano ponovitev, s srednjimi vrednostmi in koeficienti variacij za ponovitve,

— grafična predstavitev razmerja koncentracija/učinek,

▼M6

— ocene strupenosti za spremenljivke odziva, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, in pripadajoči intervali zaupanja. Če sta izračunani, vrednosti LOEC in NOEC, ter statistične metode, uporabljene za njuno določitev,

— če je bila uporabljena analiza variance, velikost opaženega učinka (npr. najmanj pomembna razlika),

— vsako spodbujanje rasti, ki se je pokazalo pri katerem koli tretiranju,

— vsi drugi opaženi učinki, npr. morfološke spremembe alg,

— razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izvirajo iz odstopanj od te preskusne metode.

LITERATURA

(1) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1993). ISO 8692 Kakovost vode – Preskus zaviranja rasti sladkovodnih alg.

(2) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1998). ISO/DIS 14442. Kakovost vode – Smernice za preskuse zaviranja rasti alg s slabo topnimi materiali, hlapnimi spojinami, kovinami in odpadno vodo.

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, št. 23. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(4) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1998). ISO 5667-16 Kakovost vode – Vzorčenje – 16. del: Navodilo za biološke preskuse vzorcev.

(5) Mayer, P., Cuhel, R., in Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525–2531.

(6) Slovacey, R. E., in Hanna, P. J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919–925

(7) Simpson, S. L., Roland, M. G. E., Stauber, J. L., in Batley, G. E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Environ. Chem.* 22: 2073–2079.

(8) Christensen, E. R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713–718.

(9) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O., in Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Environ. Chem*. 11: 157– 167.

(10) Bruce, R. D., in Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Environ. Chem*. 11: 1485– 1494.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

▼**M6**

(12) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096– 1121.

(13) Norberg-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

(15) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103– 117.

(16) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519–531.

(17) Draper, N. R., in Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, druga izdaja. Wiley, New York.

(18) Brain, P., in Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Za namene te preskusne metode se uporabljajo naslednje opredelitve in okrajšave:

Biomasa je suha teža žive snovi, prisotne v populaciji, izražena v dani prostornini; npr. miligram alg na liter preskusne raztopine. „Biomasa“ je običajno opredeljena kot masa, vendar se v tem preskusu ta beseda uporablja za označevanje mase na prostornino. V tem preskusu se običajno merijo tudi nadomestki za biomaso, kot so npr. število celic, fluorescenca itd., zato se izraz „biomasa“ uporablja tudi za meritve teh nadomestkov.

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

Koeficient variacije je merilo variabilnosti parametra brez razsežnosti, opredeljeno kot razmerje med standardnim odklonom in srednjo vrednostjo. Izraziti ga je mogoče tudi kot odstotno vrednost. Srednji koeficient variacije povprečne specifične hitrosti rasti v ponovitvenih kontrolnih kulturah se izračuna, kot sledi:

1. izračuna se KV v odstotkih povprečne specifične hitrosti rasti na dan/po posamičnih delih za vsakokratno ponovitev;

2. izračuna se srednja vrednost vseh izračunanih vrednosti v točki 1, da se pridobi srednji koeficient variacije specifične hitrosti rasti na dan/po posamičnih delih v ponovitvenih kontrolnih kulturah.

EC_x je koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v preskusnem mediju, katere rezultat je x-odstotno (npr. 50-odstotno) zmanjšanje rasti preskusnega organizma v ustreznem obdobju izpostavljenosti (navesti v primeru odstopanja od polnega ali običajnega trajanja preskusa). Za nedvoumno označitev vrednosti EC, pridobljene iz hitrosti rasti ali prirasti, se uporabljata simbola „E_rC“ za hitrost rasti in „E_yC“ za prirast.

Gojišče je povsem sintetično gojišče, v katerem rastejo preskusne alge med izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Običajno se preskusna kemikalija raztopi v preskusnem mediju.

Hitrost rasti (povprečna specifična hitrost rasti) je logaritemsko povečanje biomase v obdobju izpostavljenosti.

Najnižja koncentracija z opaznim učinkom (LOEC) je najnižja preskušena koncentracija kemikalije, pri kateri je opaziti statistično značilen učinek zmanjšanja rasti (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo v navedenem obdobju izpostavljenosti. Vendar morajo imeti vse koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni možno izpolniti, je treba podrobno pojasniti izbiro LOEC (in posledično NOEC).

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskušena koncentracija neposredno pod vrednostjo LOEC.

Spremenljivka odziva je spremenljivka za ocenitev strupenosti, izpeljana iz katerih koli izmerjenih parametrov, ki opisujejo biomaso z drugačno računsko metodo. Za to metodo sta hitrost rasti in prirast spremenljivki odziva, neposredno izpeljani iz izmerjene biomase ali katerega koli omenjenega nadomestka.

▼**M6**

Specifična hitrost rasti je spremenljivka odziva, opredeljena kot količnik razlike naravnih logaritmov opazovanega parametra (v tej preskusni metodi je to biomasa) in upoštevanega časovnega obdobja.

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Prirast je vrednost izmerjene spremenljivke ob koncu obdobja izpostavljenosti, od česar je odšteta vrednost izmerjene spremenljivke ob začetku obdobja izpostavljenosti, s katero se izrazi povečanje biomase med preskusom.

▼M6

Dodatek 2

Sevi, dokazano primerni za preskušanje

Zelene alge

Pseudokirchneriella subcapitata (prej znana kot *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.

Desmodesmus subspicatus (prej znana kot *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG.

Kremenaste alge

Navicula pelliculosa, UTEX 664.

Cianobakterije

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A.

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1.

Viri sevov

Priporočeni sevi so na voljo v kulturah z eno samo vrsto alg v naslednjih zbirkah (po abecednem vrstnem redu):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
ZDA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Združeno kraljestvo

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NEMČIJA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
ZDA

▼M6

Videz in značilnosti priporočenih vrst

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Videz	upognjene, zvite posamezne celice	ovalne, v glavnem posamezne celice	paličice	verige ovalnih celic	paličice
Velikost (D × Š) μm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Prostornina celice (μm^3/celico)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Suha teža celice (mg/celico)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Hitrost rasti (3) (dan^{-1})	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Izmerjeno z elektronskim števcem delcev.
(2) Izračunano iz velikosti.
(3) Najpogosteje opažena hitrost rasti v gojišču OECD pri obsevanosti približno 70 μE m^{-2} s^{-1} in 21 °C.

Posebna Priporočila o kultiviranju in ravnanju s priporočenimi preskusnimi vrstami

Pseudokirchneriella subcapitata in Desmodesmus subspicatus

Te zelene alge se na splošno lahko vzdržuje v različnih gojiščih kultur. Podatki o primernih gojiščih so na voljo v zbirkah kultur. Celice so navadno samotarske, meritve celične gostote pa se lahko izvedejo na enostaven način z uporabo elektronskega števca delcev ali mikroskopa.

Anabaena flos-aquae

Za gojenje založne kulture se lahko uporabijo različna gojišča. Zelo pomembno je, da se šaržni kulturi ne dopusti, da gre preko logaritemske faze rasti, kadar se obnavlja, saj je na tej stopnji obnova težka.

Anabaena flos-aquae razvije skupke ugnezdenih verig celic. Velikost teh skupkov je glede na pogoje kultiviranja lahko različna. Te skupke je pri štetju s pomočjo mikroskopa ali ob uporabi elektronskega števca delcev za določanje biomase morda treba ločiti.

Za ločevanje verig se lahko uporabi ultrazvočno razbijanje verig, da se zmanjša variabilnost štetja. Daljše ultrazvočno razbijanje od priporočenega za ločevanje verig v krajše dolžine lahko uniči celice. Jakost in trajanje ultrazvočnega razbijanja morata biti enaka za vse tretirane skupine.

Na hemocitometru se prešteje dovolj polj (najmanj 400 celic), da se nadomesti variabilnost. To bo izboljšalo zanesljivost mikroskopskega določanja gostote.

Za določanje celotnega volumna celic alg *Anabaena* po ločevanju celičnih verig z natančnim ultrazvočnim razbijanjem se lahko uporabi elektronski števec delcev. Energijo ultrazvočnega razbijanja je treba prilagoditi, da se prepreči razkroj celic.

Da se zagotovi dobro premešano in homogeno suspenzijo alg, ki se uporabi za inokulacijo preskusnih posod, se uporabi vorteks mešalnik ali podobna primerna metoda.

▼**M6**

Preskusne posode naj se postavijo na krožno in recipročno stresalno mizo pri približno 150 obratih na minuto. Alternativno se lahko uporabi prekinjeno mešanje za zmanjšanje težnje *Anabaene* po oblikovanju grud. Če se grude pojavijo, je treba paziti, da se doseže reprezentativne vzorce za merjenje biomase. Za razdrobitev grud je morda pred vzorčenjem potrebno močno mešanje.

Synechococcus leopoliensis

Za gojenje založne kulture je mogoče uporabiti različna gojišča. Podatki o primernih gojiščih so na voljo v zbirkah kultur.

Synechococcus leopoliensis raste kot samotarske celice v obliki paličic. Celice so zelo majhne, kar otežuje uporabo mikroskopskega štetja za merjenje biomase. Uporabni so elektronski števci delcev, opremljeni za štetje delcev do najmanjše velikosti približno 1 μm. Primerne so tudi *in vitro* fluorometrične meritve.

Navicula pelliculosa

Za gojenje založne kulture je mogoče uporabiti različna gojišča. Podatki o primernih gojiščih so na voljo v zbirkah kultur. Pomembno si je zapomniti, da je v gojišču zahtevan silikat.

Navicula pelliculosa lahko pri določenih rastnih pogojih oblikuje skupke. Celice alg se zaradi proizvajanja lipidov včasih kopičijo na površinski prevleki. V teh okoliščinah je potrebno zagotoviti posebne ukrepe, ko so za pridobitev reprezentativnih vzorcev odvzeti podvzorci za določanje biomase. Morda je potrebno močno stresanje, npr. z uporabo vorteks mešalnika.

▼**M6**

Dodatek 3

Gojišče

Uporabi se lahko eno od naslednjih dveh gojišč:

— Gojišče OECD: originalno gojišče OECD TG 201, tudi v skladu z ISO 8692.

— US EPA gojišče AAP, tudi v skladu z ASTM.

Pri pripravi teh gojišč je treba uporabiti kemikalije s čistostjo reagenta ali analitsko čiste kemikalije in deionizirano vodo.

Sestava gojišča AAP (US EPA) in gojišča OECD TG 201.

Element	AAP		OECD.	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MgCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Molsko razmerje med EDTA in železom je malenkost večje od ena. To preprečuje usedline železa in istočasno zmanjšuje kelacijo ionov težkih kovin.

V preskusu s kremenasto algo *Navicula pelliculosa* morata biti obe gojišči dopolnjeni z $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, da je pridobljena koncentracija 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Vrednost pH gojišča je pridobljena z ravnotežjem med karbonatnim sistemom gojišča in parcialnim tlakom CO_2 v atmosferskem zraku. Približno razmerje med vrednostjo pH pri 25 °C in molsko koncentracijo bikarbonata je:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$.

Pri 15 mg $NaHCO_3$/l je pH_{eq} = 7,5 (gojišče US EPA), pri 50 mg $NaHCO_3$/l je pH_{eq} = 8,1 (gojišče OECD).

Elementna sestava v preskusnih gojiščih

Element	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Priprava gojišča OECD

Hranilna snov	Koncentracija v založni raztopini
založna raztopina 1: makrohranilne snovi	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
založna raztopina 2: železo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
založna raztopina 3: elementi v sledovih	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Hranilna snov	Koncentracija v založni raztopini
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
založna raztopina 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Založne raztopine se sterilizirajo z membransko filtracijo (s povprečnim premerom por 0,2 μm) ali avtoklaviranjem (120 °C, 15 min). Raztopine se shranijo v temnem prostoru pri 4 °C.

Raztopin 2 in 4 se ne avtoklavira, temveč le sterilizira z membransko filtracijo.

Gojišče se pripravi z dodajanjem primerne količine založnih raztopin 1–4 vodi.

K 500 ml sterilizirane vode se doda:

10 ml založne raztopine 1,

1 ml založne raztopine 2,

1 ml založne raztopine 3,

1 ml založne raztopine 4.

Do 1 000 ml se dopolni s sterilizirano vodo.

Za vzpostavljanje ravnovesja gojišča z atmosferskim CO_2 se dopusti dovolj časa; če je potrebno, s pomočjo prepihovanja sterilnega filtriranega zraka za nekaj ur.

Priprava gojišča US EPA

1. Po 1 ml vsake založne raztopine *2.1–2.7* se dolije v približno 900 ml deionizirane ali destilirane vode, nato se raztopina razredči na 1 liter.

2. Makrohranilne založne raztopine se pridobijo z raztapljanjem spodaj navedenih snovi v 500 ml deionizirane ali destilirane vode. Reagenti *2.1, 2.2, 2.3* in *2.4* se lahko združijo v eno založno raztopino.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Mikrohranilna založna raztopina (glej 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	glej opombo 1.

▼**M6**

Opomba 1: uporablja se samo za preskusne vrste kremenastih alg. Doda se lahko neposredno (202,4 mg) ali z dodajanjem založne raztopine do končne koncentracije 20 mg/l Si v gojišču.

3. Mikrohranilna založna raztopina se pridobi z raztapljanjem spodaj navedenih snovi v 500 ml deionizirane ali destilirane vode.

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg.	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.	
3.5	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714 mg.	
3.6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[dinatrijev (etilenedinitril) tetraacetat].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	(glej opombo 2).

Opomba 2: uporablja se samo za gojišča za založne kulture vrst kremenastih alg.

4. Vrednost pH se uravna na 7,5 ± 0,1 z 0,1 *N* ali 1,0 *N* NaOH ali HCl.

5. Gojišče se filtrira v sterilni vsebnik skozi 0,22-mikronski membranski filter, če se uporabi števec delcev, ali skozi 0,45-mikronski filter, če se števec delcev ne uporabi.

6. Gojišče se do uporabe shrani v temnem prostoru pri temperaturi približno 4 °C.

▼M6

Dodatek 4

Primer postopka kultiviranja alg

Splošna opažanja

Namen kultiviranja po naslednjem postopku je pridobiti kulture alg za preskuse strupenosti.

Uporabiti je treba primerne metode, s katerimi se zagotovi, da se kulture alg ne okužijo z bakterijami. Morda so zaželene aksenične kulture, vsekakor pa je treba uvesti in uporabiti kulture z eno samo vrsto alg.

Vse postopke je treba izvesti v sterilnih pogojih, da se prepreči kontaminacija z bakterijami in drugimi algami.

Oprema in materiali

Glej v poglavju o preskusni metodi: Naprava.

Postopki za pridobivanje kultur alg

Priprava hranilnih raztopin (gojišča):

Vse hranilne soli gojišča se pripravi kot koncentrirane založne raztopine ter hrani v temnem in hladnem prostoru. Te raztopine se sterilizirajo s filtracijo ali avtoklaviranjem.

Gojišče se pripravi z dodajanjem pravilne količine založne raztopine sterilni destilirani vodi, pri čemer se pazi, da ne pride do okužbe. Za trdno gojišče se doda 0,8 % agarja.

Založna kultura:

Založne kulture so majhne kulture alg, ki se redno prenašajo v sveža gojišča in se uporabljajo kot začetni preskusni material. Če se kulture ne uporabljajo redno, se nanesejo na poševna agarska gojišča v epruvetah. Nato se najmanj enkrat na dva meseca prenesejo na sveže gojišče.

Založne kulture se gojijo v erlenmajericah z ustreznim gojiščem (volumen približno 100 ml). Kadar se alge inkubirajo pri 20 °C ob stalni osvetljenosti, jih je treba na sveže gojišče prenesti enkrat na teden.

Med prenosom se del „stare“ kulture s sterilno pipeto prenese v erlenmajerico s svežim gojiščem, tako da je pri hitro rastoči vrsti začetna koncentracija približno 100-krat manjša kot v stari kulturi.

Hitrost rasti vrste se lahko določi iz rastne krivulje. Če je ta znana, se lahko oceni gostota, pri kateri je treba kulturo prenesti v novo gojišče. To je treba storiti, preden kultura doseže fazo odmiranja.

Predkultura:

Predkultura je namenjena pridobivanju količine alg, primerne za inokulacijo preskusnih kultur. Predkultura se inkubira v pogojih preskusa in uporabi, ko je še v eksponentni fazi rasti, običajno po inkubaciji, ki traja od 2 do 4 dni. Kulture alg, ki vsebujejo deformirane ali nenormalne celice, je treba zavreči.

▼M6

Dodatek 5

Analiza podatkov z nelinearno regresijo

Splošni pomisleki

Odziv v preskusih alg in drugih mikrobioloških preskusih rasti – rast biomase – je po naravi stalna ali metrična spremenljivka: hitrost postopka, če se uporabi hitrost rasti, in njen integral v času, če je izbrana biomasa. Obe sta v povezavi z ustreznim povprečnim odzivom ponovitvenih neizpostavljenih kontrol in kažeta največji odziv pri uvedenih pogojih – s svetlobo in temperaturo kot osnovnima določevalnima dejavnikoma v preskusu alg. Sistem je porazdeljen ali homogen in biomasa lahko velja za kontinuum ne glede na posamezne celice. Porazdelitev variance vrste odziva za takšen sistem se nanaša izključno na eksperimentalne dejavnike (običajno opisane z logaritemsko normalno ali normalno porazdelitvijo napake). To je v nasprotju s tipičnimi biološkimi odzivi s kvantiziranimi podatki, pri katerih se pogosto pričakuje, da bo toleranca (tipično binominalno porazdeljena) posameznih organizmov prevladujoča komponenta variance. Odzivi kontrole so nič ali raven naravnega ozadja.

V enostavnih razmerah se normiran ali relativni odziv, r, monotono zmanjša od 1 (ničelno zaviranje) do 0 (100-odstotno zaviranje). Zapomniti si je treba, da vse odzive spremlja napaka, tako da je mogoče navidezno negativna zaviranja izračunati samo kot rezultat naključne napake.

Regresijska analiza

Modeli:

Regresijska analiza je namenjena kvantitativnemu opisovanju krivulje koncentracija-odziv v obliki matematične regresijske funkcije Y = f (C) ali bolj pogoste F(Z), kjer je Z = log C. Če se jo uporabi inverzno, potem C = f^{-1} (Y) dopušča izračun številk EC_x, vključno z EC_{50}, EC_{10} in EC_{20} in njihovimi 95-odstotnimi mejami zaupanja. Za več preprostih matematičnih funkcijskih oblik se je izkazalo, da uspešno opisujejo razmerja koncentracija-odziv, ki nastanejo v preskusih zaviranja rasti alg. Funkcije na primer vključujejo logistično enačbo, nesimetrično Weibullovo enačbo in funkcijo logaritemsko normalne porazdelitve, ki so vse sigmoidne krivulje, ki se asimptotično približujejo nič za C → 0 in ena za C → neskončno.

Uporaba stalnih funkcijskih modelov praga (npr. Kooijmanovega modela za „zaviranje rasti populacije“, Kooijman idr., 1996) je nedavno predlagana ali alternativna možnost asimptotičnim modelom. Ta model ne pričakuje učinkov pri koncentracijah pod določenim pragom, EC_0+, ki je ocenjen z ekstrapolacijo razmerja odziv-koncentracija pri preseku osi koncentracije z uporabo enostavne zvezne funkcije, ki je v začetni točki nediferenciabilna.

Treba je upoštevati, da je analiza lahko enostavno zmanjšanje vsot preostalih kvadratov (pričakovana konstantna varianca) ali tehtanih kvadratov, če se izravnava heterogenost variance.

Postopek

Ta postopek se izvede, kot sledi: izberemo ustrezno funkcijsko enačbo, Y = f(C), in jo z nelinearno regresijo prilagodimo podatkom. Raje kot srednje vrednosti ponovitev uporabimo meritve iz vsake posamezne bučke, da zberemo toliko podatkov, kot je le mogoče. Če je varianca visoka, praktične izkušnje kažejo,

▼M6

da lahko srednje vrednosti ponovitev zagotavljajo bolj robustno matematično oceno, na katero manj vplivajo naključne napake v podatkih, kot pa pri vsaki ohranjeni posamezni podatkovni točki.

Izrišemo prilagojeno krivuljo in izmerjene podatke ter preverimo, ali je krivulja ustrezno prilagojena. Analiza ostankov je lahko za ta namen še posebej koristno orodje. Če izbrano funkcijsko razmerje, ki naj ustreza odzivu pri posameznih koncentracijah, ne odraža celotne krivulje ali njenega pomembnega dela, na primer odziva pri nizkih koncentracijah, namesto simetrične izberemo drugo možnost prilagajanja krivulje – npr. nesimetrično krivuljo, kot je Weibullova funkcija. Negativna zaviranja rasti lahko povzročajo težave, na primer pri logaritemsko normalni porazdelitveni funkciji, ki prav tako zahteva alternativno regresijsko funkcijo. Takšnim negativnim vrednostim ni priporočeno dodeliti ničelne ali majhne pozitivne vrednosti, ker to izkrivi porazdelitve napak. Morda je primerno narediti ločene prilagoditve krivulj na delih krivulje, kot je del z nizkim zaviranjem rasti, da se oceni številke EC_{lowx}. Iz prilagojene enačbe (z „inverzno oceno“, $C = f^{-1}(Y)$) izračunamo karakteristične ocenjene vrednosti EC_x ter poročamo najmanj o ocenah EC_{50} in eni ali dveh ocenah $EC_{low\ x}$. Izkušnje s praktičnim preskušanjem so pokazale, da natančnost preskusov alg navadno dopušča sprejemljivo natančno ovrednotenje pri 10-odstotni stopnji zaviranja rasti, če so podatkovne točke zadovoljive – razen če se pri nizkih koncentracijah kot moteč dejavnik pojavi spodbujanje rasti. Natančnost ocene EC_{20} je pogosto znatno boljša kot ocena EC_{10}, ker je EC_{20} navadno na približno linearnem delu osrednje krivulje koncentracija-odziv. Včasih je EC_{10} težko razložiti zaradi spodbujanja rasti. Zato je, medtem ko je EC_{10} navadno dosežena z zadostno natančnostjo, priporočeno tudi stalno poročanje o EC_{20}.

Utežni faktorji

Eksperimentalna varianca pogosto ni konstantna in značilno vsebuje sorazmerno komponento, zato je bolj primerna rutinsko izvedena tehtana regresija. Utežni faktorji za takšno analizo se navadno predpostavljajo kot obratno sorazmerni varianci.

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Veliko regresijskih programov dopušča možnost analize tehtane regresije z utežnimi faktorji, ki so navedeni v preglednici. Ustrezno naj se utežni faktorji normalizirajo tako, da se jih pomnoži z $n/\Sigma\ w_i$ (n je število podatkovnih točk), tako da je njihova vsota enaka ena.

Normalizacija odzivov

Normaliziranje s povprečnim odzivom kontrole povzroča nekatere temeljne težave in prinaša precej zapleteno strukturo variance. Z deljenjem odzivov s povprečnim odzivom kontrole za pridobitev deleža zaviranja rasti uvedemo dodatno napako, ki jo povzroči napaka pri srednji vrednosti kontrole. Razen če je napaka zanemarljivo majhna, morajo biti utežni faktorji v regresiji in meje zaupanja popravljeni za kovarianco s kontrolo (Draper in Smith, 1981). Treba je upoštevati, da je velika natančnost pri ocenjenem povprečnem odzivu kontrole pomembna, da se lahko zmanjša celotna varianca za relativni odziv. Ta varianca je:

(podpisani i se nanaša na raven koncentracije i in podpisana 0 na kontrole)

$$Y_i = \text{relativni odziv} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼M6

z varianco $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi/\partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

in ker je $(\partial\ Y_i/\partial\ r_i) = 1/r_0$ in $(\partial\ Y_i/\partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

z normalno porazdeljenimi podatki ter m_i in m_0 ponovitvami: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

celotna varianca relativnega odziva, Y_i postane:

$$Var\ (Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Napaka srednje vrednosti kontrole je obratno sorazmerna s kvadratnim korenom števila povprečnih kontrolnih ponovitev in se včasih lahko določi, da se vključi podatke preteklih študij in tako zelo zmanjša napake. Alternativni postopek ni normaliziranje podatkov in prilagajanje absolutnih odzivov, vključno s podatki odziva kontrole, temveč predstavitev vrednosti odziva kontrole kot dodatnega parametra, ki ga je treba prilagoditi z nelinearno regresijo. Z običajno 2-parametrsko regresijsko enačbo je pri tej metodi potrebno prilagajanje 3 parametrov in zato zahteva več podatkovnih točk kot nelinearna regresija na podatkih, ki so normalizirani z uporabo vnaprej določenega odziva kontrole.

Obratni intervali zaupanja

Izračun intervalov zaupanja nelinearne regresije z obratno oceno je bolj zapleten in v navadnih statističnih računalniških programskih paketih ni razpoložljiv kot standardna možnost. Približne meje zaupanja se lahko pridobijo s standardnimi programi nelinearne regresije s ponovno parameterizacijo (Bruce in Versteeg, 1992), ki vključuje predelavo matematične enačbe z želenimi ocenjenimi vrednostmi, npr. EC_{10} in EC_{50}, kot parametri, ki se jih mora oceniti. (Naj bo funkcija $I = f\ (\alpha, \beta,$ koncentracija) in izkoristimo razmerja definicij $f\ (\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ in $f\ (\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$, da nadomestimo $f\ (\alpha, \beta,$ koncentracija) z enakovredno funkcijo $g\ (EC_{10}, EC_{50},$ koncentracija).)

Bolj neposredni izračun (Andersen idr., 1998) se izvede tako, da obdržimo izvirno enačbo in uporabimo Taylorjev raztezek pri srednjih vrednostih za r_i in r_0.

Nedavno so postale priljubljene metode vezanja. Take metode uporabljajo izmerjene podatke in naključno ponovno vzorčenje, ki se izbere z generatorjem naključnih števil, da se oceni empirična porazdelitev variance.

VIRI

Kooijman, S. A. L. M., Hanstveit, A. O., Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625–1632.

Draper, N. R., in Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, druga izdaja. Wiley, New York.

Bruce, R. D., in Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485–1494.

Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., in Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.

▼B

C.4 DOLOČANJE „DOBRE“ BIORAZGRADLJIVOSTI

Del I SPLOŠNO

I.1 UVOD

Opisanih je šest preskusnih metod, ki omogočajo presejalno preskušanje snovi glede lahke biorazgradljivosti v aerobnem vodnem mediju:

(a) Upadanje raztopljenega organskega ogljika (DOC) (Metoda C.4-A)

(b) Prilagojeno presejanje OECD – upadanje DOC (Metoda C.4-B)

(c) Razvijanje ogljikovega dioksida (CO_2) (prilagojeni Sturmov preskus) (Metoda C.4-C)

(d) Manometrična respirometrija (Metoda C.4-D)

(e) Zaprta steklenica (Metoda C.4-E)

(f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japonska) (Metoda C.4-F)

Splošne in skupne opombe za vseh šest preskusov so navedene v delu I metode. Posebnosti za posamezne metode so navedene v delih II do VII. Dodatki vsebujejo opredelitve, enačbe in navodila.

Medlaboratorijska primerjava, ki jo je OECD izvedel leta 1988, je pokazala, da metode dajejo dosledne rezultate. Vendar je glede na fizikalne lastnosti preskusne snovi lahko bolj primerna ena ali druga od metod.

I.2 IZBIRA USTREZNE METODE

Za izbiro najprimernejše metode so potrebne informacije o topnosti, parnem tlaku in adsorpcijskih lastnostih snovi. Za izračun teoretičnih vrednosti in/ali preverjanje izmerjenih vrednosti parametrov, npr. TPK, TCO_2, DOC, TOC, KPK (glej dodatka 1 in 2) je treba poznati kemično strukturo ali formulo.

Preskusne snovi, topne v vodi do najmanj 100 mg/l, se lahko preskusijo z vsemi metodami, pod pogojem da so nehlapne in neadsorptivne. Za tiste snovi, ki so slabo topne v vodi, hlapne ali adsorptivne, so primerne metode navedene v tabeli 1. Načini ravnanja s snovmi, ki so slabo topne v vodi, in hlapnimi snovmi so opisani v Dodatku 3. Zmerno hlapne snovi se lahko preskušajo po metodi upadanja DOC, če je v preskusnih posodah (ki morajo biti ustrezno zaprte) dovolj prostora za plin. V tem primeru je treba izvesti abiotsko kontrolo, da se upoštevajo vse fizikalne izgube.

▼B

Tabela 1

Uporabnost preskusnih metod

Preskus	Analitska metoda	Primernost za snovi, ki so:		
		slabo topne	hlapne	adsorptivne
Upadanje DOC	Raztopljeni organski ogljik	—	—	+/-
Prilagoj. metoda OECD upadanja DOC	Raztopljeni organski ogljik	—	—	+/-
Razvijanje CO_2	Respirometrija: razvijanje CO_2	+	—	+
Manometrična respirometrija-	Manometrična respirometrija: poraba kisika	+	+/-	+
Zaprta steklenica	Respirometrija: raztopljeni kisik	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: poraba kisika	+	+/-	+

Za razlago dobljenih rezultatov so potrebne informacije o čistoti ali relativnih deležih glavnih sestavin preskusne snovi, zlasti kadar so rezultati nizki ali mejni.

Informacije o strupenosti preskusne snovi za bakterije (Dodatek 5) so lahko uporabne za izbiro primernih preskusnih koncentracij in so lahko bistvene za pravilno razlago nizkih vrednosti biorazgradljivosti.

I.3 REFERENČNE SNOVI

Za preverjanje postopka se preskusijo referenčne snovi, ki izpolnjujejo merila za dobro biorazgradljivost, s postavitvijo primerne steklenice vzporedno z navadnimi preskusnimi vzorci.

Primerne snovi so anilin (sveže destiliran), natrijev acetat in natrijev benzoat. Te referenčne snovi se pri teh metodah vse razgradijo, tudi kadar se namerno ne doda noben inokulum.

Predlagano je bilo, da se poišče taka referenčna snov, ki je dobro biorazgradljiva, vendar potrebuje dodan inokulum. Predlagan je bil kalijev hidorgen fosfat, vendar je treba pridobiti več podatkov za to snov, preden se lahko sprejme kot referenčna snov.

Pri respirometričnih preskusih lahko snovi, ki vsebujejo dušik, vplivajo na sprejem kisika zaradi nitrifikacije (glej dodatka 2 in 5).

I.4 PRINCIP PRESKUSNIH METOD

Raztopina ali suspenzija preskusne snovi v mineralnem mediju se inokulira in inkubira v aerobnih pogojih v temi ali razpršeni svetlobi. Količina DOC v preskusni raztopini, ki izvira iz inokuluma, mora biti čim manjša glede na količino DOC, ki izvira iz preskusne snovi. Endogena aktivnost inokuluma se preverja z vzporednim slepim preskusom z inokulumom in brez preskusne snovi, čeprav se endogena aktivnost celic v prisotnosti snovi ne bo povsem skladala s tisto v kontrolnem vzorcu. Za preverjanje postopkov pa se vzporedno izvede preskus samo z referenčno snovjo.

▼B

Na splošno se razgradnja spremlja z določanjem parametrov, kot so DOC, CO_2, proizvodnja in sprejem kisika, meritve pa se izvajajo dovolj pogosto, da je omogočena določitev začetka in konca biorazgradnje. Pri avtomatskih respirometrih je merjenje neprekinjeno. DOC se včasih meri poleg še enega parametra, vendar navadno le na začetku in na koncu preskusa. Specifične kemijske analize se lahko uporabijo za določanje primarne razgradnje preskusne snovi in koncentracije kakršnega koli vmesnega proizvoda (obvezno pri preskusu MITI).

Navadno preskus traja 28 dni. Lahko pa se zaključi pred 28. dnem, t.j. takoj, ko krivulja biorazgradnje doseže konstantno vrednost pri najmanj treh določitvah. Preskus se lahko tudi podaljša preko 28 dni, kadar krivulja kaže, da se je biorazgradnja začela, vendar 28. dan še ni dosegla konstantne vrednosti.

I.5 MERILA KAKOVOSTI

I.5.1 **Obnovljivosti**

Zaradi narave biorazgradnje in mešanih populacij bakterij, ki se uporabijo kot inokulum, je treba izvesti najmanj dve vzporedni določitvi.

Splošna izkušnja je, da večja kot je koncentracija mikroorganizmov, dodanih preskusnemu mediju, manjše bodo razlike med ponovitvami. Testi primerljivosti so tudi pokazali, da so razlike med rezultati različnih laboratorijev lahko velike, vendar so pri dobro biorazgradljivih snoveh rezultati običajno kar skladni.

I.5.2 **Veljavnost preskusa**

Preskus se šteje za veljavnega, če je razlika med skrajnimi ponovitvenimi vrednostmi odstranitve preskusne snovi bodisi ob konstantni vrednosti bodisi na koncu preskusa bodisi ob koncu 10-dnevnega okna manj kot 20 % in če je odstotek razgradnje referenčne snovi dosegel raven za dobro biorazgradljivost v 14 dneh. Če kateri koli od teh pogojev ni izpolnjen, je treba preskus ponoviti. Zaradi strogosti teh metod, nizke vrednosti ne pomenijo nujno, da preskusna snov ni biorazgradljiva v okoljskih pogojih, temveč kažejo na to, da bodo za določitev biorazgradljivosti potrebne dodatne raziskave.

Če je bila v preskusu strupenosti, ki je vseboval preskusno in referenčno snov, razgradnja v 14 dneh manj kot 35 % (glede na DOC) ali manj kot 25 % (glede na TPK ali TCO_2), se lahko predpostavlja, da je preskusna snov inhibitorna (glej tudi Dodatek 4). Preskusni niz je treba ponoviti, če je mogoče z manjšo koncentracijo preskusne snovi in/ali večjo koncentracijo inokuluma, vendar ne nad 30 mg trdnih delcev/liter.

I.6 SPLOŠNI POSTOPKI IN PRIPRAVE

Splošni pogoji za preskuse so povzeti v tabeli 2. Aparatura in drugi preskusni pogoji, ki se nanašajo posebej na posamezne preskuse so opisani pod naslovi posameznih preskusov.

▼B

Tabela 2

Preskusni pogoji

Preskus	Upadanje DOC	Razvijanje CO_2	Manometrična respirometrija	Prilagojen presejalni preskus OECD	Zaprta steklenica	MITI (I)
Koncentracija preskusne snovi kot						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg ThOD/l			50–100		5–10	
Koncentracija inokuluma (v celicah/ln pribiližno)	≤ 30 mg/l SS ali ≤ 100 ml odtoka/l (10^7–10^8)			0,5 ml sekundarnega odtoka (10^5)	≤ 5 ml odtoka/l (10^4–10^6)	30 mg/l SS (10^7–10^8)
Koncentracija elementov v mineralnem mediju (v mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05–0,1				0,05–0,1	0,15
pH	7,4± 0,2 po možnosti 7,0					Po možnosti7,0
Temperatuura	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = raztopljeni organski ogljik ThoD = teoretična poraba kisika SS = neraztopljene trdne snovi

I.6.1 **Voda za redčenje**

Uporabi se deionizirana ali destilirana voda brez inhibitornih koncentracij strupenih snovi (npr. ionov Cu^{++}). Ne sme vsebovati več kot 10 % organskega ogljika, vnesenega s preskusno snovjo. Velika čistost preskusne vode je nujna za odpravo visokih vrednosti slepih vzorcev. Okužba lahko nastane zaradi vsebovanih nečistot in tudi zaradi ionsko-izmenjevalnih smol in liziranega materiala iz bakterij in alg. Za vsak niz preskusov je treba uporabiti eno samo serijo vode, predhodno preverjeno z analizo DOC. Tako preverjanje ni potrebno pri preskusu z zaprto steklenico, vendar mora biti poraba kisika vode majhna.

▼B

I.6.2 **Osnovne raztopine mineralnih sestavin**

Za pripravo preskusnih raztopin se pripravijo osnovne raztopine mineralnih sestavin ustreznih koncentracij. Za metodo upadanja DOC, prilagojeni sejalni preskus OECD, preskus razvijanja CO_2, manometrično respirometrijo in preskus z zaprto steklenico se lahko uporabijo naslednje osnovne raztopine (z različnimi faktorji redčenja).

Faktorji redčenja in, za preskus MITI, posebna priprava mineralnega medija so navedeni pod naslovi posameznih preskusov.

Osnovne raztopine:

Pripravimo naslednje osnovne raztopine iz analitsko čistih reagentov.

(a)	Monokalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalijev monohidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatrijev monohidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40 g
	Amonijev klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra. pH raztopine mora biti 7,4.	
(b)	Kalcijev klorid, brezvodni, $CaCl_2$	27,50 g
	ali kalcijev klorid dihidrat, $CaCl_2, 2 H_2O$	36,40 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	
(c)	Magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra	
(d)	Železov(III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 . 6 H_2O$	0,25 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	

Opomba: Da nam te raztopine ne bo treba pripraviti tik pred uporabo, ji dodamo kapljico koncentrirane HCl ali 0,4 g natrijeve soli etilendiamintetraocetne kisline (EDTA) na liter.

I.6.3 **Osnovne raztopine snovi**

Kadar topnost presega 1 g/l, raztopimo 1–10 g, kakor je primerno, preskusne ali referenčne snovi v deionizirani vodi in dopolnimo do 1 litra. V nasprotnem primeru pripravimo osnovne raztopine v mineralnem mediju ali snov dodamo neposredno v mineralni medij. Ravnanje z manj topnimi snovmi je opisano v Dodatku 3, vendar se za preskus MITI (metoda C.4-F) ne smejo uporabiti ne topila ne emulgatorji.

▼B

I.6.4 **Inokulumi**

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivno blato, komunalne odplake (neklorirane), površinske vode in prsti ali njihove zmesi. Kadar se za preskuse upadanja DOC, razvijanja CO_2 in manometrične respirometrije uporabi aktivno blato, mora biti odvzeto iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjske odplake. Ugotovljeno je bilo, da inokulumi iz drugih virov dajo bolj razpršene rezultate. Za prilagojeni presejalni preskus OECD in preskus z zaprto steklenico je potreben bolj razredčen inokulum brez kosmov in najprimernejši vir je sekundarni odtok iz čistilne naprave za gospodinjske odplake ali laboratorijske enote. Inokulum za preskus MITI se pridobi iz zmesi virov in je opisan pod naslovom za ta preskus.

I.6.4.1 *Inokulum iz aktivnega blata*

Zberemo svež vzorec aktivnega blata iz prezračevalnega bazena čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki čisti predvsem gospodinjske odplake. Odstranimo grobe delce, če je potrebno s filtriranjem skozi fino sito, in nato vzdržujemo blato aerobno.

Druga možnost je, da ga po odstranitvi grobih delcev pustimo, da se posede ali ga centrifugiramo (npr. 10 min pri 1 100 g). Supernatant zavržemo. Blato lahko speremo v mineralnem mediju. Koncentrirano blato suspendiramo v mineralnem mediju, tako da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi 3–5 g/l, in prezračujemo do uporabe.

Blato je treba odvzeti iz pravilno delujoče konvencionalne čistilne naprave. Če je bilo blato odvzeto iz čistilne naprave z visoko stopnjo čiščenja ali če se domneva da vsebuje inhibitorje, ga je treba sprati. Resuspendirano blato po temeljitem mešanju pustimo, da se posede, ali ga centrifugiramo, zavržemo supernatant in sprano blato ponovno suspendiramo v dodatnem volumnu mineralnega medija. Postopek ponavljamo, dokler ne menimo, da je blato brez presežnega substrata ali inhibitorjev.

Tik pred uporabo popolnoma resuspendiranega blata ali neobdelanega blata odvzamemo vzorec za določitev suhe mase neraztopljenih trdnih snovi.

Dodatna možnost je, da aktivno blato homogeniziramo (3–5 g neraztopljenih trdnih snovi/l). Blato obdelujemo z mehanskim mešalnikom 2 minuti pri srednji hitrosti. Zmešano blato naj se poseda 30 minut, če je potrebno tudi dlje, nato odlijemo tekočino, ki jo uporabimo kot inokulum v koncentraciji 10 ml/l mineralnega medija.

I.6.4.2 *Drugi viri inokuluma*

Lahko se pridobi iz sekundarnega odtoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjske odplake. Zberemo svež vzorec in ga med prevozom vzdržujemo v aerobnem stanju. Pustimo, da se poseda 1 uro, ali ga filtriramo skozi grobi filtrirni papir in supernatant oziroma filtrat vzdržujemo v aerobnem stanju do uporabe. Na liter medija se lahko uporabi do 100 ml takega inokuluma.

▼B

Še en vir inokuluma je površinska voda. V tem primeru odvzamemo vzorec ustrezne površinske vode, npr. reke, jezera, in ga vzdržujemo v aerobnem stanju do uporabe. Če je potrebno inokulum koncentriramo s filtriranjem ali centrifugiranjem.

I.6.5 **Aklimatizacija inokulumov**

Inokulumi se lahko predhodno aklimatizirajo na preskusne pogoje, ne smejo pa se prilagoditi na preskusno snov. Aklimatizacija vključuje prezračevanje aktivnega blata v mineralnem mediju ali sekundarnega odtoka 5–7 dni pri temperaturi preskusa. Aklimatizacija včasih izboljša natančnost preskusnih metod, tako da zniža vrednosti slepih vzorcev. Pri MITI aklimatizacija inokuluma ni potrebna.

I.6.6 **Abiotski kontrolni vzorci**

Kadar je potrebno, preverimo ali pride do abiotske razgradnje preskusne snovi, tako da določimo odstranitev DOC, sprejem kisika ali razvijanje ogljikovega dioksida v sterilnih kontrolnih vzorcih brez inokuluma. Steriliziramo s filtriranjem skozi membranski filter (0,2–0,45 mikrometrov) ali z dodatkom ustrezne strupene snovi v ustrezni koncentraciji. Če uporabimo membranski filter, vzorce odvzamemo aseptično, da ohranimo sterilnost. Če adsorpcija preskusne snovi ni bila izključena že prej, morajo preskusi, ki merijo biorazgradnjo kot odstranitev DOC, zlasti tisti z inokulumom iz aktivnega blata, vključevati abiotski kontrolni vzorec, ki je inokuliran in zastrupljen.

I.6.7 **Število steklenic**

Število steklenic v značilnem preskusu je navedeno pod naslovom za posamezni preskus.

Lahko se uporabijo naslednje vrste vzorcev:

— Preskusna suspenzija: vsebuje preskusno snov in inokulum

— Slepi vzorec z inokulumom: vsebuje le inokulum

— Vzorec za kontrolo postopka: vsebuje referenčno snov in inokulum

— Abiotski sterilni kontrolni vzorec: sterilen, vsebuje preskusno snov (glej I.6.6)

— Vzorec za kontrolo adsorpcije: vsebuje preskusno snov, inokulum in sterilizacijsko sredstvo

— Vzorec za kontrolo strupenosti: vsebuje preskusno snov, referenčno snov in inokulum

Določanje v preskusni suspenziji in slepem vzorcu z inokulumom mora obvezno potekati vzporedno. Priporočljivo je, da se tudi določanje v drugih vzorcih izvaja vzporedno.

To sicer ni vedno možno. Zagotovimo, da je dovolj vzorcev ali odčitkov za oceno odstotka odstranitve v 10-dnevnem oknu.

▼B

I.7 PODATKI IN OCENA

Pri izračunavanju odstotka razgradnje, D_t, se uporabijo srednje vrednosti podvojenih meritev parametra v preskusnih posodah in slepem vzorcu z inokulumom. Enačbe so navedene v spodnjih oddelkih za posamezne preskuse. Grafično se prikaže potek razgradnje in označi 10-dnevno okno. Izračunata se odstotek odstranitve ob koncu 10-dnevnega okna in vrednost ob konstantni koncentraciji ali ob koncu preskusa, kar je primerno, in navedeta v poročilu.

Pri respirometričnih preskusih lahko snovi, ki vsebujejo dušik, vplivajo na sprejem kisika zaradi nitrifikacije (glej dodatka 2 in 5).

I.7.1 **Razgradnja merjena z določanjem DOC**

Odstotek razgradnje, D_t, ob vsakem vzorčenju se izračuna posebej za steklenice, ki vsebujejo preskusno snov, z uporabo srednjih vrednosti ponovljenih meritev DOC, da se lahko oceni veljavnost preskusa (glej I.5.2). Izračuna se po naslednji enačbi:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

pri čemer je:

D_t = % razgradnje ob času t,

C_0 = srednja začetna koncentracija DOC v inokuliranem mediju, ki vsebuje preskusno snov (mg DOC/l),

C_t = srednja koncentracija DOC v inokuliranem mediju, ki vsebuje preskusno snov, ob času t (mg DOC/l),

C_{b0} = srednja začetna koncentracija DOC v slepem inokuliranem mineralnem mediju (mg DOC/l),

C_{bt} = srednja koncentracija DOC v slepem inokuliranem mineralnem mediju ob času t (mg DOC/l).

Vse koncentracije se izmerijo s preskusi.

I.7.2 **Razgradnja, merjena s specifično analizo**

Kadar so na voljo specifični analitski podatki, se primarna biorazgradnja izračuna po:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

pri čemer je:

D_t = % razgradnje ob času t, običajno 28 dni,

S_a = količina ostanka preskusne snovi v inokuliranem mediju ob koncu preskusa (mg),

S_b = količina ostanka preskusne snovi v slepem vzorcu z vodo/medijem, kateremu je bila dodana le preskusna snov (mg).

▼B

I.7.3 **Abiotska razgradnja**

Kadar se uporabi abiotski sterilni kontrolni vzorec, se izračuna odstotek abiotske razgradnje po enačbi:

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

pri čemer je:

$C_{S(o)}$ = koncentracija DOC v sterilnem kontrolnem vzorcu ob dnevu 0

$C_{s(t)}$ = koncentracija DOC v sterilnem kontrolnem vzorcu ob dnevu t

I.8 POROČANJE

Poročilo o preskusu, če je možno, vsebuje naslednje podatke:

— preskusna in referenčna snov ter njuna čistota,

— preskusni pogoji,

— inokulum: vrsta in mesto(-a) vzorčenja, koncentracija in kakršna koli aklimatizacija,

— delež in vrsta industrijskih odpadkov, prisotnih v odplaki, če sta znana,

— trajanje preskusa in temperatura,

— pri slabo topnih preskusnih snoveh, uporabljena obdelava,

— uporabljena preskusna metoda; treba je navesti znanstvene razloge in obrazložitev za vsako spremembo v postopku,

— podatkovni list,

— vsi opaženi pojavi zaviranja,

— vsaka opažena abiotska razgradnja,

— specifični kemijski analitski podatki, če so na voljo,

— analitski podatki o vmesnih proizvodih, če so na voljo,

— graf odstotka razgradnje v odvisnosti od časa za preskusno in referenčno snov; jasno je treba označiti fazo prilagajanja, fazo razgradnje, 10-dnevno okno in naklon (Dodatek 1). Če preskus izpolnjuje merila za veljavnost, se lahko za graf uporabijo srednje vrednosti odstotka razgradnje v steklenicah s preskusno snovjo.

— odstotek odstranitve po 10-dnevnem oknu in ob doseženi konstantni koncentraciji ali ob koncu preskusa.

Del II **PRESKUS UPADANJA DOC** (Metoda C.4-A)

II. PRINCIP METODE

Izmerjeni volumen inokuliranega mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (10–40 mg DOC/l) kot edinega vira organskega ogljika, se prezračuje v temi ali na razpršeni svetlobi pri 22 ± 2 °C.

▼B

Razgradnja se spremlja 28 dni prek analize DOC v pogostih presledkih. Stopnja biorazgradnje se izračuna tako, da se koncentracija odstranjenega DOC (popravljena glede na slepi vzorec z inokulumom) izrazi kot odstotek koncentracije na začetku preskusa. Stopnja primarne biorazgradnje se lahko izračuna tudi iz dopolnilne kemijske analize, izvedene na začetku in na koncu inkubacije.

II.2 OPIS METODE

II.2.1 **Aparatura**

(a) erlenmajerice, npr. 250 ml do 2 l, odvisno od volumna, potrebnega za analizo DOC;

(b) stresalnik, primeren za erlenmajerice, bodisi z avtomatskim uravnavanjem temperature bodisi v prostoru s konstantno temperaturo in dovolj močan, da vzdržuje aerobne pogoje v vseh erlenmajericah;

(c) filtrirna naprava z ustreznimi membranskimi filtri;

(d) analizator DOC;

(e) aparatura za določanje raztopljenega kisika;

(f) centrifuga.

II.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1l.

II.2.3 **Priprava in aklimatizacija inokuluma**

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odplak, površinskih vod, prsti ali zmesi teh virov.

Glej I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 in I.6.5.

II.2.4 **Priprava steklenic**

Kot primer, v 2l erlenmajerice damo po 800 ml mineralnega medija in v posamezne erlenmajerice dodamo ustrezno količino osnovne raztopine preskusne ali referenčne snovi, da bo koncentracija snovi enakovredna 10–40 mg DOC/l. Preverimo pH vrednost in jo po potrebi uravnamo na 7,4. Erlenmajerice inokuliramo z aktivnim blatom ali inokulumom iz kakega drugega vira (glej I.6.4), tako da bo končna koncentracija neraztopljenih trdnih snovi največ 30 mg/l. Pripravimo tudi kontrolne vzorce z inokulumom v mineralnem mediju brez preskusne ali referenčne snovi.

Če je potrebno, uporabimo eno posodo za preverjanje morebitnega inhibitornega učinka preskusne snovi, tako da inokuliramo raztopino, ki vsebuje primerljivi koncentraciji preskusne in referenčne snovi v mineralnem mediju.

Če je potrebno pripravimo tudi sterilni vzorec za preverjanje, ali se preskusna snov razgrajuje abiotsko, tako da uporabimo neinokulirano raztopino snovi (glej I.6.6).

▼B

Če sumimo, da se preskusna snov znatno adsorbira na steklo, blato itd., s predhodnim preskusom določimo verjetno stopnjo adsorpcije in s tem primernost preskusa za snov (glej tabelo 1). Pripravimo erlenmajerico s preskusno snovjo, inokulumom in sterilizacijskim sredstvom.

Vse erlenmajerice dopolnimo z mineralnim medijem do 1 l, premešamo in iz vsake erlenmajerice vzamemo vzorec za določitev začetne koncentracije DOC (glej Dodatek 2.4). Odprtine erlenmajeric pokrijemo, npr. z aluminijasto folijo, tako da je omogočena prosta izmenjava zraka med erlenmajerico in ozračjem. Erlenmajerice postavimo v stresalnik in tako začnemo preskus.

II.2.5 **Število steklenic v značilnem preskusu**

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Abiotski sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo adsorpcije

Steklenica 8: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

II.2.6 **Izvedba preskusa**

Ves čas preskusa v znanih časovnih intervalih določamo koncentracijo DOC v vsaki steklenici v podvojenih meritvah, in sicer dovolj pogosto, da lahko določimo začetek 10-dnevnega okna in odstotek odstranitve na koncu 10-dnevnega okna. Odvzamemo le najmanjši volumen preskusne suspenzije, potreben za vsako določitev.

Če je potrebno, pred vzorčenjem nadomestimo izgube zaradi izhlapevanja, tako da dodamo ustrezno količino vode za redčenje (I.6.1). Pred odvzemom vzorca medij temeljito premešamo in zagotovimo, da se material, prilepljen na steno posode, raztopi ali suspendira. Vzorce takoj po odvzemu membransko filtriramo ali centrifugiramo (glej Dodatek 2.4). Filtrirane ali centrifugirane vzorce analiziramo isti dan ali pa jih shranimo pri temperaturi 2–4 ^{o}C za največ 48 ur ali pod –18 ^{o}C za daljše obdobje.

II.3 PODATKI IN POROČANJE

II.3.1 **Obdelava rezultatov**

Izračunamo odstotek razgradnje ob času t iz I.7.1 (Določanje DOC) in, neobvezno, iz I.7.2 (specifična analiza).

Vse rezultate zapišemo na predvidene podatkovne liste.

▼B

II.3.2 **Veljavnost rezultatov**

Glej I.5.2.

II.3.3 **Poročanje**

Glej I.8.

II.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS UPADANJA DOC

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA**

3. **PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna koncentracija v mediju, to: ... mg/l kot snov

4. **INOKULUM**

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. **DOLOČITVE OGLJIKA**

Analizator ogljika:

	Št. steklenice		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Preskusna snov in inokulum	1	a_1					
		A_2					
		a, srednja vrednost $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, srednja vrednost $C_{b(t)}$					

▼B

	Št. steklenice		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slepi vzorec z inokulumom in brez preskusne snovi	3	C_1					
		C_2					
		c, srednja vrednost $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, srednja vrednost $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VREDNOTENJE NEOBDELANIH PODATKOV**

Št. steklenice		% razgradnje po n dneh				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednja vrednost (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Če je med D_1 in D_2 velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika

7. **ABIOTSKA KONTROLA** (neobvezno)

	Čas (dnevi)	
	0	t
Konc. DOC (mg/l) v sterilnih kontrolnih vzorcih	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIČNA KEMIČNA ANALIZA** (neobvezno)

	Količina ostanka preskusne snovi ob koncu preskusa (mg/l)	% primarne razgradnje
Sterilni kontrolni vzorec	S_b	

▼B

	Količina ostanka preskusne snovi ob koncu preskusa (mg/l)	% primarne razgradnje
Inokulirani preskusni medij	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Del III **PRILAGOJENI PRESEJALNI PRESKUS OECD** (Metoda C.4-B)

III.1 PRINCIP METODE

Izmerjeni volumen mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (10–40 mg DOC/l) kot edinega vira organskega ogljika, se inokulira z 0,5 ml odtoka na liter medija. Zmes se prezračuje v temi ali na razpršeni svetlobi pri 22 ± 2 °C.

Razgradnja se spremlja 28 dni prek analize DOC v pogostih presledkih. Stopnja biorazgradnje se izračuna tako, da se koncentracija odstranjenega DOC (popravljena glede na slepi vzorec z inokulumom) izrazi kot odstotek koncentracije na začetku preskusa. Stopnja primarne biorazgradnje se lahko izračuna tudi iz dopolnilne kemijske analize, izvedene na začetku in na koncu inkubacije.

III.2 OPIS METODE

III.2.1 Aparatura

(a) Erlenmajerice, npr. 250 ml do 2 l, odvisno od volumna, potrebnega za analizo DOC;

(b) stresalnik – primeren za erlenmajerice, bodisi z avtomatskim uravnavanjem temperature bodisi v prostoru s konstantno temperaturo in dovolj močan, da vzdržuje aerobne pogoje v vseh erlenmajericah;

(c) filtrirna naprava z ustreznimi membranskimi filtri;

(d) analizator DOC;

(e) aparatura za določanje raztopljenega kisika;

(f) centrifuga.

III.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 litra.

Pri tej metodi se za inokulum uporabi le 0,5 ml odtoka/liter, zato bo medij morda treba okrepiti z elementi v sledeh in rastnimi faktorji. To se stori tako, da se na liter končnega medija doda po 1 ml vsake od naslednjih raztopin:

▼B

Raztopine elementov v sledeh:

Manganov sulfat tetrahidrat, $MnSO_4.4H_2O$	39,9 mg
Borova kislina, H_3BO_3	57,2 mg
Cinkov sulfat heptahidrat, $ZnSO_4.7H_2O$	42,8 mg
Amonijev heptamolibdat $(NH_4)_6$ Mo_7O_24	34,7 mg
Fe-helat ($FeCl_3$ etilendiamin-tetra-ocetna kislina)	100,0 mg
Raztopimo v vodi za redčenje in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 000 ml.	
Raztopina vitaminov	
Kvasni ekstrakt	15,0 mg

Kvasni ekstrakt raztopimo v 100 vode. Steriliziramo s filtriranjem skozi 0,2-mikronsko membrano ali pripravimo sveže.

III.2.3 **Priprava in aklimatizacija inokuluma**

Inokulum se lahko pridobi iz sekundarnega odtoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjske odplake. Glej I.6.4.2 in I.6.5.

Uporabi se 0,5 ml na liter mineralnega medija.

III.2.4 **Priprava steklenic**

Kot primer, v 2-litrske erlenmajerice damo po 800 ml mineralnega medija in v posamezne erlenmajerice dodamo ustrezno količino osnovne raztopine preskusne ali referenčne snovi, da bo koncentracija snovi enakovredna 10–40 mg DOC/liter. Preverimo pH vrednost in jo po potrebi uravnamo na 7,4. Erlenmajerice inokuliramo s komunalno odplako v koncentraciji 0,5 ml/liter (glej I.6.4.2). Pripravimo tudi kontrolne vzorce z inokulumom v mineralnem mediju brez preskusne ali referenčne snovi.

Če je potrebno, uporabimo eno posodo za preverjanje morebitnega inhibitornega učinka preskusne snovi, tako da inokuliramo raztopino, ki vsebuje primerljivi koncentraciji preskusne in referenčne snovi v mineralnem mediju.

Če je potrebno pripravimo tudi sterilni vzorec za preverjanje, ali se preskusna snov razgrajuje abiotsko, tako da uporabimo neinokulirano raztopino snovi (glej I.6.6).

Če sumimo, da se preskusna snov znatno adsorbira na steklo, blato itd., s predhodnim preskusom določimo verjetno stopnjo adsorpcije in s tem primernost preskusa za snov (glej tabelo 1). Pripravimo erlenmajerico s preskusno snovjo, inokulumom in sterilizacijskim sredstvom.

Vse erlenmajerice dopolnimo z mineralnim medijem do 1 litra, premešamo in iz vsake erlenmajerice vzamemo vzorec za določitev začetne koncentracije DOC (glej Dodatek 2.4). Odprtine erlenmajeric pokrijemo, npr. z aluminijasto folijo, tako da je omogočena prosta izmenjava zraka med erlenmajerico in ozračjem. Erlenmajerice postavimo v stresalnik in tako začnemo preskus.

▼B

III.2.5 **Število steklenic v značilnem preskusu**

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka ter

po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Abiotski sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo adsorpcije

Steklenica 8: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi 1.6.7.

III.2.6 **Izvedba preskusa**

Ves čas preskusa v znanih časovnih intervalih določamo koncentracijo DOC v vsaki steklenici v podvojenih meritvah, in sicer dovolj pogosto, da lahko določimo začetek 10-dnevnega okna in odstotek odstranitve na koncu 10-dnevnega okna. Odvzamemo le najmanjši volumen preskusne suspenzije, potreben za vsako določitev.

Če je potrebno, pred vzorčenjem nadomestimo izgube zaradi izhlapevanja, tako da dodamo ustrezno količino vode za redčenje (I.6.1). Pred odvzemom vzorca medij temeljito premešamo in zagotovimo, da se material, prilepljen na steno posode, raztopi ali suspendira. Vzorce takoj po odvzemu membransko filtriramo ali centrifugiramo (glej Dodatek 2.4). Filtrirane ali centrifugirane vzorce analiziramo isti dan ali pa jih shranimo pri temperaturi 2–4 °C za največ 48 ur ali pod –18 °C za daljše obdobje.

III.3 PODATKI IN POROČANJE

III.3.1 **Obdelava rezultatov**

Izračunamo odstotek razgradnje ob času t iz I.7.1 (Določanje DOC) in, neobvezno, iz I.7.2 (specifična analiza).

Vse rezultate zapišemo na predvidene podatkovne liste.

III.3.2 Veljavnost rezultatov

Glej I.5.2.

III.3.3 Poročanje

Glej I.8.

III.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRILAGOJENI PRESEJALNI PRESKUS OECD

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA**

▼B

3. **PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna koncentracija v mediju, to: ... mg/l kot snov

4. **INOKULUM**

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. **DOLOČITVE OGLJIKA**

Analizator ogljika:

	Št. steklenice		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Preskusna snov in inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, srednja vrednost $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, srednja vrednost $C_{b(t)}$					
Slepi vzorec z inokulumom in brez preskusne snovi	3	C_1					
		C_2					
		c, srednja vrednost $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, srednja vrednost $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VREDNOTENJE NEOBDELANIH PODATKOV**

Št. steklenice		% razgradnje po n dneh				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Št. steklenice		% razgradnje po n dneh				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Srednja vrednost ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Če je med D_1 in D_2 velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupensosti se lahko uporabi podobna oblika.

7. **ABIOTSKA KONTROLA** (neobvezno)

	Čas (dnevi)	
	0	t
Konc. DOC (mg/l) v sterilnih kontrolnih vzorcih	$C_{S(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIČNA KEMIJSKA ANALIZA** (neobvezno)

	Kakiāna ostarika preskusne snovi ob koncu preskusa	% primarne razgradnje
Sterilni kontrolni vzorec	S_b	
Inokulirani preskusni modij	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Del **PRESKUS RAZVIJANJA CO_2**(Metoda C.4-C)

IV.1 PRINCIP METODE

Izmerjeni volumen inokuliranega mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (10–20 mg DOC ali TOC/l) kot edinega vira organskega ogljika, se prezračuje z uvajanjem zraka brez ogljikovega dioksida z nadzorovano hitrostjo v temi ali na razpršeni svetlobi. Razgradnja se spremlja 28 dni z določanjem proizvedenega ogljikovega dioksida, ki se ujame v barijev ali natrijev hidroksid in izmeri s titracijo preostalega hidroksida ali kot anorganski ogljik. Količina ogljikovega dioksida, proizvedenega iz preskusne snovi (popravljena glede na slepi vzorec z inokulumom), se izrazi kot odstotek TCO_2. Stopnja biorazgradnje se lahko izračuna tudi iz dopolnilne analize DOC, izvedene na začetku in na koncu inkubacije.

▼B

IV.2 OPIS METODE

IV.2.1 **Aparatura**

(a) Buče, 2–5 litrov, vsaka opremljena s prezračevalno cevjo, ki sega skoraj do dna bučke, in odvodno odprtino;

(b) magnetna mešala, kadar se preskušajo slabo topne snovi;

(c) steklenice za absorpcijo plina;

(d) naprava za uravnavanje in merjenje zračnega pretoka;

(e) aparatura za izpiranje ogljikovega dioksida, za pripravo zraka brez ogljikovega dioksida; lahko pa se uporabi zmes kisika brez CO_2 in dušika brez CO_2 iz plinskih jeklenk v pravem razmerju (20 % O_2 in 80 % N_2);

(f) naprava za določanje ogljikovega dioksida, bodisi titrimetrično ali s kako obliko analizatorja anorganskega ogljika;

(g) naprava za membransko filtracijo (neobvezno);

(h) analizator DOC (neobvezno).

IV.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 l.

IV.2.3 **Priprava in aklimatizacija inokuluma**

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odplak, površinskih vod, prsti ali zmesi teh virov.

Glej I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 in I.6.5.

IV.2.4 **Priprava steklenic**

Naslednji volumni in mase se na primer nanašajo na 5-litrske steklenice, ki vsebujejo 3 l suspenzije. Če se uporabijo manjši volumni, je treba vrednosti ustrezno spremeniti, vendar hkrati zagotoviti točno merjenje nastalega ogljikovega dioksida.

V vsako 5-litrsko steklenico damo 2 400 ml mineralnega medija. Dodamo ustrezen volumen pripravljenega aktivnega blata (glej I.6.4.1 in I.6.5), da bo v končnih 3 l inokulirane zmesi koncentracija neraztopljenih trdnih snovi največ 30 mg/l. Druga možnost je, da pripravljeno blato najprej razredčimo z mineralnim medijem, da dobimo suspenzijo 500–1 000 mg/l, nato dodamo ustrezen alikvot vsebini 5-litrske steklenice, da dobimo koncentracijo 30 mg/l; ta način zagotavlja večjo natančnost. Lahko se uporabijo drugi viri inokuluma (glej I.6.4.2).

Te inokulirane zmesi čez noč prezračujemo z zrakom brez CO_2, da iz sistema izperemo ogljikov dioksid.

▼B

V vzporedne steklenice dodamo ločeno preskusno snov in referenčno snov, kot znani volumen osnovnih raztopin, tako da bo dobljena koncentracija DOC ali TOC, ki ga prispeva dodana snov, 10 do 20 mg/l; za kontrolo inokuluma v nekaj steklenic ne dodamo snovi. Slabo topne preskusne snovi dodamo neposredno v steklenice, na podlagi mase ali volumna, ali ravnamo z njimi, kakor je opisano v Dodatku 3.

Če je potrebno, uporabimo eno steklenico za preverjanje morebitnega inhibitornega učinka preskusne snovi, tako da vanjo damo preskusno in referenčno snov v koncentracijah, enakih koncentracijam v drugih steklenicah.

Če je potrebno pripravimo tudi sterilni vzorec za preverjanje, ali se preskusna snov razgrajuje abiotsko, tako da uporabimo neinokulirano raztopino snovi (glej I.6.6). Steriliziramo z dodatkom strupene snovi v primerni koncentraciji.

Suspenzije v vseh erlenmajericah dopolnimo do 3 l z mineralnim medijem, predhodno prezračevanim z zrakom brez CO_2. Po izbiri lahko vzamemo vzorce za analizo DOC (glej Dodatek 2.4) in/ali specifično analizo. Na odvodne odprtine erlenmajeric priključimo absorpcijske steklenice.

Če uporabimo barijev hidroksid, na vsako 5-litrsko erlenmajerico zaporedno priključimo po tri absorpcijske steklenice s po 100 ml 0,0125 M raztopine barijevega hidroksida. V raztopini ne sme biti oborjenega sulfata in karbonata in tik pred uporabo je treba določiti njeno koncentracijo. Če uporabimo natrijev hidroksid, priključimo dva lovilnika, drugega za potrditev, da se je v prvem absorbiral ves ogljikov dioksid. Primerne so absorpcijske steklenice, opremljene z zapirali za serumske steklenice. V vsako steklenico dodamo 200 ml 0,05 M natrijevega hidroksida, kar je dovolj za absorpcijo celotne količine ogljikovega dioksida, ki se razvije pri popolni razgradnji preskusne snovi. Raztopina natrijevega hidroksida vsebuje sledi karbonatov, tudi ko je sveže pripravljena; to se popravi z odštetjem količine ogljika v slepem vzorcu.

IV.2.5 **Število steklenic v značilnem preskusu**

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

ter po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Abiotski sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

IV.2.6 **Izvedba preskusa**

Preskus pričnemo s črpanjem zraka brez CO_2 skozi suspenzije s hitrostjo 30–100 ml/min. Periodično odvzamemo vzorce absorbenta ogljikovega dioksida za analizo vsebnosti CO_2. Prvih deset dni je priporočljivo analize izvesti vsak drugi ali tretji dan, nato pa vsak peti dan do 28. dne, da se lahko določi 10-dnevno okno.

▼B

Osemindvajseti dan odvzamemo vzorce (neobvezno) za DOC in/ali specifično analizo, izmerimo pH suspenzij in dodamo po 1 ml koncentrirane klorovodikove kisline v vsako steklenico; steklenice čez noč prezračujemo, da iz preskusnih suspenzij izženemo ves ogljikov dioksid. Devetindvajseti dan izvedemo zadnjo analizo razvitega ogljikovega dioksida.

Ob dnevih, ko merimo CO_2, odklopimo steklenici najbližji absorber z barijevim hidroksidom in raztopino hidroksida titriramo z 0,05 M HCl ob fenolftaleinu kot indikatorju. Preostale absorberje prestavimo za eno mesto bliže steklenici, na konec verige pa priključimo nov absorber s 100 ml svežega 0,0125 M barijevega hidroksida. Titriramo po potrebi, na primer, ko opazimo znatno obarjanje v prvem lovilniku in preden se obarjanje začne v drugem, ali najmanj enkrat na teden. Kadar kot absorbent uporabimo natrijev hidroksid, z brizgo odvzamemo majhen vzorec (odvisno od lastnosti uporabljenega analizatorja ogljika) raztopine natrijevega hidroksida iz absorberja, ki je najbliže steklenici. Vzorec injiciramo v IC-del analizatorja ogljika za neposredno analizo razvitega ogljikovega dioksida.

Vsebino drugega lovilnika analiziramo šele ob koncu preskusa, da upoštevamo popravke zaradi morebitnega prehajanja ogljikovega dioksida naprej.

IV.3 PODATKI IN POROČANJE

IV.3.1 **Obdelava rezultatov**

Količina v absorberju ujetega CO_2, določena s titracijo, se izračuna po:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

pri čemer je:

V = volumen HCl, porabljen za titracijo 100 ml absorbenta (ml),

C_B = koncentracija raztopine barijevega hidroksida (M),

C_A = koncentracija raztopina klorovodikove kisline (M),

če je C_B enak 0,0125 M in C_A enak 0,05 M, se za titracijo 100 ml barijevega hidroksida porabi 50 ml, je masa CO_2:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI porabljeni pri titraciji} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

V tem primeru je torej faktor za pretvorbo pri titraciji porabljene HCl v mg CO_2 enak 1,1.

Iz ustreznih vrednosti, dobljenih pri titraciji, izračunamo maso CO_2, proizvedenega samo iz inokuluma ter iz inokuluma in preskusne snovi; razlika je masa CO_2, proizvedenega iz preskusne snovi.

Če na primer pri vzorcu z inokulumom porabimo za titracijo 48 ml ter pri vzorcu z inokulumom in preskusno snovjo 45 ml,

CO_2 iz inokuluma = 1,1 × (50 - 48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 iz inokuluma in preskusne snovi skupaj = 1,1 × (50 - 45) = 5,5 mg

torej je masa CO_2, proizvedenega iz preskusne snovi, enaka 3,3 mg.

Odstotek biorazgradnje se izračuna po enačbi:

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{mg proizvedenega } CO_2 \times 100}{TCO_2 \times \text{mg dodane preskusne snovi}}$$

ali

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{mg proizvedenega } CO_2 \times 100}{\text{mg Tv preskusu dodanega TCO} \times 3{,}67}$$

pri čemer je 3,67 faktor pretvorbe (44/12) ogljika v ogljikov dioksid.

Odstotek razgradnje po vsakem časovnem intervalu določimo tako, da seštejemo odstotke TCO_2, izračunane za vsak dan do dneva meritve.

Pri absorberjih z natrijevim hidroksidom, količino proizvedenega ogljikovega dioksida, izraženega kot anorganski ogljik IC (mg), izračunamo tako, da koncentracijo IC v absorbentu pomnožimo z volumnom absorbenta.

Odstotek razgradnje izračunamo po enačbi:

$$\% \text{ } TCO_2 = \frac{\text{mg IC v preskusni steklenici} - \text{mg IC v slepem vzorcu}}{\text{MG TOC dodanega kot preskusna snov}} \times 100$$

Odstranitev DOC (neobvezno) izračunamo, kakor je opisano v I.7. Te in vse druge rezultate zapišemo na predvidene podatkovne liste.

IV.3.2 **Veljavnost rezultatov**

Vsebnost IC v suspenziji preskusne snovi v mineralnem mediju mora biti na začetku preskusa manj kot 5 % TC in skupni CO_2, razvit v slepem vzorcu z inokulumom, na koncu preskusa ne sme preseči 40 mg/l medija. Če dobljene vrednosti presežejo 70 mg CO_2/liter, je treba kritično preveriti podatke in tehniko preskušanja.

Glej tudi I.5.2.

IV.3.3 **Poročanje**

Glej I.8.

IV.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS RAZVIJANJA OGLJIKOVEGA DIOKSIDA

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA**

3. **PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

▼B

Začetna konc. v mediju: ... mg/l kot snov

Skupni C, dodan v steklenico: ... mg C

TCO_2: ... mg CO_2

4. **INOKULUM**

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: mg/liter

5. **PROIZVODNJA OGLJIKOVEGA DIOKSIDA IN RAZGRADLJIVOST**

Metoda Ba(OH)/NaOH/drugo

Čas (dan)	Nastali CO_2 preskusni vzorec (mg)		Nastali CO_2 slepi vzorec (mg)		Nastali CO_2 kumulativni (mg) (preskusni minus slepi vzorec, srednja vrednost)		TCO_2cumulative $\frac{CO_2}{TCO_2} \times 100$		
	1 / 2	srednja vrednost	3 / 4	srednja vrednost	1	2	1	2	srednja vrednost
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

6. **ANALIZA OGLIJIKA** (neobvezno)

Analizator ogljika:

Čas (dan)	Slepi vzorec mg/l	Preskusna snov mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t

([1]) ali ob koncu inkubacije.

▼B

$$\% \text{ odstranjenega DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTSKA RAZGRADNJA** (neobvezno)

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{CO_2 \text{ proizveden v sterilni steklenici po 28 dneh (mg)}}{TCO_2 (\text{mg})} \times 100$$

Del V **PRESKUS MANOMETRIČNE RESPIROMETRIJE** (Metoda C.4-D)

V.1 PRINCIP METODE

Izmerjeni volumen inokuliranega mineralnega medija, ki vsebuje znano koncentracijo preskusne snovi (100 mg preskusne snovi/l, da dobimo najmanj 50–100 mg TPK/l) kot edinega vira organskega ogljika, se do 28 dni meša v zaprti steklenici pri konstantni temperaturi (± 1 °C ali manj). Poraba kisika se določi bodisi z merjenjem količine kisika (elektrolitsko proizvedenega), potrebne za ohranjanje konstantnega volumna plina v respirometrski steklenici, bodisi iz spremembe volumna ali tlaka (ali kombinacije obeh) v aparaturi. Razviti ogljikov dioksid se absorbira v raztopini kalijevega hidroksida ali drugega ustreznega absorbenta. Količina kisika, ki jo porabi preskusna snov (popravljena glede na sprejem pri slepem vzorcu z inokulumom, preskušenem vzporedno) se izrazi kot odstotek TPK ali KPK. Po izbiri se lahko izračunata primarna biorazgradnja iz dopolnilne specifične analize, opravljene na začetku in na koncu inkubacije, ter popolna biorazgradnja z analizo DOC.

V.2 OPIS METODE

V.2.1 **Aparatura**

(a) ustrezni respirometer;

(b) termostat, ki vzdržuje konstantno temperaturo do ± 1 °C ali bolj natančno;

(c) naprava za membransko filtracijo (neobvezno);

(d) analizator ogljika (neobvezno).

V.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo 10 ml raztopine (a) in 800 ml vode za redčenje, dodamo po 1 ml raztopin (b) do (d) in dopolnimo z vodo za redčenje do 1 litra.

V.2.3 **Priprava in aklimatizacija inokuluma**

Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odplak, površinskih vod in prsti ali zmesi teh virov.

Glej I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 in I.6.5.

V.2.4 **Priprava steklenic**

Iz osnovnih raztopin pripravimo ločene serije raztopin preskusne in referenčne snovi v mineralnem mediju, ki ustrezajo koncentraciji 100 mg snovi/l (da dobimo najmanj 50–100 mg TPK/l).

▼B

TPK izračunamo na podlagi tvorbe amonijevih soli, razen če pričakujemo nitrifikacijo, takrat mora izračun temeljiti na tvorbi nitrata (glej Dodatek 2.2).

Določimo pH vrednost in jo po potrebi uravnamo na 7,4± 0,2.

Slabo topne snovi se dodajo pozneje (glej spodaj).

Če bomo določali strupenost preskusne snovi, pripravimo dodatno raztopino v mineralnem mediju, ki vsebuje preskusno in referenčno snov v istih koncentracijah, kakor posamezne raztopine.

Če potrebujemo meritev fizikalno-kemijskega sprejema kisika, pripravimo raztopino preskusne snovi, navadno v koncentraciji 100 mg TPK/l, ki jo steriliziramo z dodatkom ustrezne strupene snovi (glej I.6.6).

V steklenice, najmanj po dve za vsako vrsto vzorca, damo potrebne volumne raztopin preskusne in referenčne snovi. Pripravimo dodatne steklenice z le mineralnim medijem (za kontrolo inokuluma) ter, če je potrebno, z zmesjo raztopin preskusne in referenčne snovi in s sterilno raztopino.

Če je preskusna snov slabo topna, jo dodamo v tej fazi, neposredno v steklenico, na podlagi mase ali volumna, ali ravnamo z njo, kakor je opisano v Dodatku 3. V razdelke CO_2-absorberja damo kalijev hidroksid, tablete zmesi natrijevega ali kalijevega hidroksida in kalcijevega oksida ali kak drug absorbent.

V.2.5 **Število steklenic v značilnem preskusu**

Steklenici 1 in 2: Preskusna suspenzija

Steklenici 3 in 4: Slepi vzorec z inokulumom

Steklenica 5: Vzorec za kontrolo postopka

po možnosti in kadar je potrebno:

Steklenica 6: Sterilni kontrolni vzorec

Steklenica 7: Vzorec za kontrolo strupenosti

Glej tudi I.6.7.

V.2.6 **Izvedba preskusa**

Počakamo, da steklenice dosežejo želeno temperaturo, in ustrezne steklenice inokuliramo s pripravljenim aktivnim blatom ali inokulumom iz drugega vira, tako da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi največ 30 mg/l. Sestavimo aparaturo, vklopimo mešalnik, preverimo nepredušnost in začnemo meriti sprejem kisika. Običajno nam ni treba storiti nič drugega, kot opraviti potrebne odčitke in dnevno preverjati, ali se vzdržujeta prava temperatura in ustrezno mešanje.

Sprejem kisika izračunamo iz vrednosti, odčitanih v rednih in pogostih intervalih po metodah, ki jih navaja proizvajalec opreme. Ob koncu inkubacije, navadno po 28 dneh, izmerimo pH vsebine steklenic, zlasti če je sprejem kisika manjši ali večji od $ThODNH_4$ (za snovi, ki vsebujejo dušik).

▼B

Če je potrebno, iz respirometrskih steklenic na začetku in na koncu odvzamemo vzorce za analizo DOC ali specifično kemijsko analizo (glej Dodatek 2.4). Ob prvem odvzemu zagotovimo, da je volumen preostale preskusne suspenzije v steklenici znan. Kadar kisik sprejema preskusna snov, ki vsebuje dušik, določimo povečanje koncentracije nitrita in nitrata v 28 dneh ter izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji (Dodatek 5).

V.3 PODATKI IN POROČANJE

V.3.1 **Obdelava rezultatov**

Količino kisika (mg), ki ga sprejme preskusna snov po določenem času (popravljeno glede na sprejem v slepem vzorcu za kontrolo inokuluma v istem času), delimo z uporabljeno maso preskusne snovi. Tako dobimo BPK, izražen v mg kisika/mg preskusne snovi, to je

$$\text{BPK} = \frac{(\text{mg sprejetega } O_2 \text{ pri preskusni snovi} - \text{mg sprejetega } O_2 \text{ pri slepem vzorcu})}{(\text{mg preskusne snovi v steklenici})}$$

= mg O_2 na mg preskusne snovi.

odstotek razgradnje izračunamo po enačbi:

$$\%\ \text{biorazgradnje} = \%\ \text{TPK} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg snovi})}{\text{TPK}(\text{mg } O_2 \text{ snovi})} \times 100$$

ali po enačbi

$$\%\ \text{KPK} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg snovi})}{\text{KPK}(\text{mg } O_2 \text{ snovi})} \times 100$$

Opozoriti je treba, da ti dve metodi ne dasta nujno enakega rezultata; priporočena je uporaba prve metode.

Pri snoveh, ki vsebujejo dušik, uporabimo ustrezni TPK (NH_4 ali $N0_3$), glede na to kaj vemo ali pričakujemo glede nitrifikacije (Dodatek 2.2). Če pride do nitrifikacije, ki pa je nepopolna, izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji, iz sprememb v koncentraciji nitrita in nitrata (Dodatek 5).

Kadar določimo organski ogljik in/ali izvedemo specifično kemično analizo, odstotek razgradnje izračunamo, kakor je opisano v I.7.

Vse rezultate zapišemo na priložene podatkovne liste.

V.3.2 **Veljavnost rezultatov**

Sprejem kisika v slepem vzorcu z inokulumom je navadno 20–30 mg O_2/l in ne sme biti večji od 60 mg/l v 28 dneh. Pri vrednostih nad 60 mg/l je treba kritično preveriti podatke in tehniko preskušanja. Če je pH vrednost izven območja 6–8,5 in poraba kisika pri preskusni snovi pod 60 %, je treba preskus ponoviti z manjšo koncentracijo preskusne snovi.

Glej tudi I.5.2.

▼B

V.3.3 **Poročanje**

Glej I.8.

V.4 **PODATKOVNI LIST**

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS MANOMETRIČNE RESPIROMETRIJE

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA**

3. **PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/liter

Začetna koncentracija v mediju, C_o: ... mg/liter

Volumen v preskusni steklenici (V): ... ml

TPK ali KPK: ... mg O_2/mg preskusne snovi (NH_4 or NO_3)

4. **INOKULUM**

Vir:

Obdelava:

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v reakcijski zmesi: ... mg/l

5. **SPREJEM KISIKA: BIORAZGRADLJIVOST**

		Čas (dan)											
		0		7		14			21			28	
Spr. O_2 (mg) preskusna snov	1												
	2												
	a, srednja vrednost												
Spr. O_2 (mg) slepi vzorec	3												
	4												
	b, srednja vrednost												
Popravljeni BPK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BPK na mg preskusne snovi	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Čas (dan)											
		0		7		14			21			28	
% razgradnje $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	srednja vrednost ([1])												

V = volumen medija v preskusni steklenici.
([1]) Če je med D_1 in D_2 velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: za referenčno snov in vzorce za kontrolo strapenosti se lahko uporabi podobna oblika.

6. **POPRAVEK ZA NITRIFIKACIJO** (glej Prilogo V)

Päev		0	28	Erinevus
(i)	Koncentracija nitrata (mg N/l),			(N)
(ii)	Ekvivalent kisika (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Koncentracija nitrita (mg N/l)			(N)
(iv)	Ekvivalent kisika (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Skupni ekvivalent kisika	—	—	

7. **ANALIZA OGLJIKA** (neobvezno)

Analizator ogljika:

Čas (dan)	Slepi vzorec (mg/l)	Preskusna snov mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 ([1])	(C_{blt})	(C_t)

([1]) ali ob koncu inkubacije.

$$\% \text{ odstranjenega DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIČNA ANALIZA** (neobvezno)

S_b = Koncentracija v fizikalno-kemijskem (sterilnem) kontrolnem vzorcu po 28 dneh

S_a = Koncentracija v inokulirani steklenici po 28 dneh,

$$\% \text{ biorazgradnje} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTSKA RAZGRADNJA** (neobvezno)

a = poraba kisika v sterilnih steklenicah po 28 dneh,

$$\text{poraba kisika na mg preskusne snovi} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(glej oddelka 1 in 3)

$$\% \text{ abiotske razgradnje} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

Del **▼PRESKUS Z ZAPRTO STEKLENICO** (METODA C.4-E)

VI.1 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Raztopina preskusne snovi v mineralnem mediju, običajno 2–5 mg/l, se inokulira z relativno majhnim številom mikroorganizmov iz mešane populacije in hrani v do vrha napolnjenih zaprtih steklenicah v temi pri konstantni temperaturi. Razgradnja se spremlja 28 dni prek analize raztopljenega kisika. Količina kisika, ki jo porabi preskusna snov (popravljena glede na sprejem pri slepem vzorcu z inokulumom, preskušenem vzporedno), se izrazi kot odstotek TPK ali KPK.

VI.2 OPIS METODE

VI.2.1 **Aparatura**

(a) BPK-steklenice s steklenimi zamaški, npr. 250–300 ml;

(b) vodna kopel ali inkubator, za hranjenje steklenic pri konstantni temperaturi (± 1 °C ali bolj natančno) in brez svetlobe;

(c) velike steklenice (2–5 litrov) za pripravo medijev in polnjenje BPK-steklenic;

(d) kisikova elektroda in merilnik ali oprema in reagenti za titracijo po Winklerju.

VI.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravo osnovnih raztopin glej v I.6.2.

Zmešamo po 1 ml raztopin (a) do (d) in dopolnimo do 1 litra z vodo za redčenje.

VI.2.3 **Priprava inokuluma**

Inokulum se navadno pridobi iz sekundarnega odtoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, ki prejema predvsem gospodinjske odplake. Drugi vir inokuluma je površinska voda. Navadno uporabimo od ene kapljice (0,05 ml) do 5 ml filtrata na liter medija; morda bo treba s poskusi ugotoviti najprimernejši volumen za določen odtok (glej I.6.4.2 in I.6.5).

VI.2.4 **Priprava steklenic**

Mineralni medij močno prezračujemo najmanj 20 minut. Vsak niz preskusov izvedemo z mineralnim medijem iz iste serije. Na splošno je medij pripravljen za uporabo po 20 h pri temperaturi preskusa. Za namene kontrole določimo koncentracijo raztopljenega kisika; vrednost mora biti približno 9 mg/l pri 20 °C. Vse postopke prenašanja in polnjenja z medijem, nasičenim z zrakom, opravimo tako, da v njem ne nastajajo mehurčki, na primer z uporabo sifonov.

▼B

Pripravimo vzporedne skupine BPK-steklenic za določanje preskusne in referenčne snovi v sočasnih preskusnih nizih. Pripravimo zadostno število BPK-steklenic, vključno s slepimi vzorci z inokulumom, da omogočimo podvojene meritve porabe kisika v želenih časovnih intervalih, npr. po 0, 7, 14, 21 in 28 dneh. Lahko bo potrebnih več steklenic, da se omogoči določitev 10-dnevnega okna.

V velike steklenice damo popolnoma prezračen mineralni medij, tako da so napolnjene do približno ene tretjine. Nato v posamezne steklenice dodamo dovolj osnovne raztopine preskusne snovi ali referenčne snovi, da je končna koncentracija snovi največ 10 mg/l. V dodatno steklenico za slepi vzorec z medijem ne dodamo nobene snovi.

Da je zagotovljeno, da aktivnost inokuluma ni omejena, koncentracija raztopljenega kisika v BPK-steklenicah ne sme pasti pod 0,5 mg/l. To omejuje koncentracijo preskusne snovi na približno 2 mg/l. Pri slabo razgradljivih snoveh in tistih z majhnim TPK, lahko uporabimo tudi 5–10 mg/l. V nekaterih primerih je priporočljivo izvesti vzporedna niza z dvema različnima koncentracijama preskusne snovi, na primer z 2 in s 5 mg/l. Navadno TPK izračunamo na podlagi tvorbe amonijevih soli, če pa pričakujemo ali vemo, da bo potekala nitrifikacija, ga izračunamo na podlagi tvorbe nitrata ($ThOD_{NO3}$: glej Dodatek 2.2). Če je nitrifikacija nepopolna, vendar se pojavi, izračunamo popravke glede na spremembe v koncentraciji nitrita in nitrata, določene z analizo (glej Dodatek 5).

Če bomo preučevali strupenost preskusne snovi (na primer, kadar je bila predhodno določena nizka vrednost biorazgradljivosti), potrebujemo dodaten niz steklenic.

Pripravimo še eno veliko steklenico, ki vsebuje prezračen mineralni medij (do približno ene tretjine volumna) ter preskusno in referenčno snov v končnih koncentracijah, enakih tistim v drugih velikih steklenicah.

Raztopine v velikih steklenicah inokuliramo s sekundarnim odtokom (ena kapljica ali približno 0,05 ml do 5 ml na liter) ali drugim virom, kot je rečna voda (glej I.6.4.2). Nato raztopine dopolnimo do volumna s prezračenim mineralnim medijem, preko cevi, ki sega do dna steklenice, da dosežemo ustrezno mešanje.

VI.2.5 **Število steklenic v značilnem preskusu**

V značilnem preskusu se uporabijo naslednje steklenice:

— najmanj 10 steklenic, ki vsebujejo preskusno snov in inokulum (preskusna suspenzija),

— najmanj 10 steklenic, ki vsebujejo le inokulum (slepi vzorec z inokulumom),

— najmanj 10 steklenic, ki vsebujejo referenčno snov in inokulum (kontrola postopka),

▼B

— in, kadar je potrebno, 6 steklenic, ki vsebujejo preskusno snov, referenčno snov in inokulum (kontrola strupenosti). Da pa bi zagotovo omogočili določitev 10-dnevnega okna, bi potrebovali še enkrat toliko steklenic.

VI.2.6 Izvedba preskusa

Vsako pripravljeno raztopino s cevjo, ki sega v spodnjo četrtino velike steklenice (ne do dna), takoj prenesemo v BPK-steklenice ustrezne skupine, tako da so vse BPK-steklenice napolnjene do vrha. Rahlo potrkamo po steklenici, da odstranimo vse zračne mehurčke. V steklenicah za čas nič takoj določimo raztopljeni kisik z metodo po Winklerju ali z elektrodo. Vsebina steklenic se lahko shrani za poznejšo analizo po Winklerju, tako da se ji doda manganov(II) sulfat in natrijev hidroksid (prvi reagent po Winklerju). Steklenice, ki vsebujejo kisik, fiksiran kot rjavi manganov(III) hidroksid, previdno zapremo in shranimo v temi pri 10–20 °C za največ 24 ur, preden nadaljujemo s postopkom po Winklerju. Preostale steklenice zamašimo, pri čemer zagotovimo, da v njih ni zračnih mehurčkov, in jih inkubiramo pri 20 °C v temi. Vsak niz mora spremljati popoln vzporedni niz za določanje slepega inokuliranega medija. V ustreznih časovnih intervalih (najmanj tedensko) 28 dnevne inkubacije odvzamemo vzorce iz najmanj po dveh vzporednih steklenic na niz za določitev raztopljenega kisika.

Tedenski vzorci bi morali omogočiti oceno odstotka odstranitve v 14-dnevnem oknu, vzorčenje na 3–4 dni pa bi moralo omogočiti določitev 10-dnevnega okna, za kar je potrebnih približno dvakrat toliko steklenic.

Pri snoveh, ki vsebujejo dušik, je treba izračunati popravke za porabo kisika pri nitrifikaciji. V ta namen za določitev koncentracije raztopljenega kisika uporabimo metodo s kisikovo elektrodo in nato iz BPK-steklenice odvzamemo vzorec za določitev nitrita in nitrata. Iz povečanja koncentracije nitrita in nitrata izračunamo porabljeni kisik (glej Dodatek 5).

VI.3 PODATKI IN POROČANJE

VI.3.1 **Obdelava rezultatov**

Najprej izračunamo BPK po vsakem časovnem intervalu, tako da porabo kisika (mg O_2/l) v slepem vzorcu z inokulumom odštejemo od tiste v vzorcu s preskusno snovjo. Tako popravljeno porabo delimo s koncentracijo (mg/l) preskusne snovi, da dobimo specifični BPK, izražen kot mg kisika na mg preskusne snovi. Izračunamo odstotek biorazgradljivosti, tako da specifični BPK delimo s specifičnim TPK (izračunanim v skladu z Dodatkom 2.2) ali KPK (določenim z analizo, glej Dodatek 2.3), tako je:

$$\mathrm{BOD} = \frac{(\text{mg sprejetega } O_2 \text{ pri preskusni snovi} - \text{mg sprejetega } O_2 \text{ pri slepem vzorcu})}{(\text{mg preskusne snovi v steklenici})}$$

▼B

= mg O_2 na mg preskusne snovi

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg preskusne snovil})}{\text{TPK}(\text{mg } O_2/\text{mg preskusne snovil})} \times 100$$

ali

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg preskusne snovil})}{\text{KPK}(\text{mg } O_2/\text{mg preskusne snovil})} \times 100$$

Opozoriti je treba, da ti dve metodi ne dasta nujno enakega rezultata; priporočena je uporaba prve metode.

Pri snoveh, ki vsebujejo dušik, uporabimo ustrezni TPK (NH_4 ali NO_3), glede na to kaj vemo ali pričakujemo glede nitrifikacije (Dodatek 2.2). Če pride do nitrifikacije, ki pa je nepopolna, izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji, iz sprememb v koncentraciji nitrita in nitrata (Dodatek 5).

VI.3.2 **Veljavnost rezultatov**

Poraba kisika v slepem vzorcu z inokulumom po 28 dneh ne sme preseči 1,5 mg raztopljenega kisika/l. Pri višjih vrednostih je treba preveriti preskusne tehnike. Koncentracija preostalega kisika v preskusnih steklenicah nikoli ne sme pasti pod 0,5 mg/l. Tako nizka raven kisika je primerna le, če se taka raven lahko točno določi z uporabljeno metodo za določanje raztopljenega kisika.

Glej tudi I.5.2.

VI.3.3 **Poročanje**

Glej I.8.

VI.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS Z ZAPRTO STEKLENICO

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA**

3. **PRESKUSNA SNOV**

   Ime:

   Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/liter

   Začetna koncentracija v steklenici: ... mg/liter

   TPK ali KPK: ... mg O_2/mg preskusne snovi

4. **INOKULUM**

   Vir:

   Obdelava:

▼B

Aklimatizacija, če je bila opravljena:

Koncentracija v reakcijski zmesi: ... mg/liter

5. **DOLOČANJE DO**

Metoda: Winkler/elektroda

Analize steklenic

Čas inkubacije (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Slepi vzorec (brez snovi)	1	C_1				
	2	C_2				
Srednja vrednost	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Preskusna snov	1	a_1				
	2	a_2				
Srednja vrednost	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Opomba: Za referenčno snov in vzarec za kontrolo strapenosti se lahko uporabi podobna oblika.

6. **POPRAVEK ZA NITRIFIKACIJO** (glej Prilogo V)

Čas inkubacije (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Koncentracija nitrata (mg N/l)				
(ii)	Sprememba Koncentracije nitrata (mg N/l)	—			
(iii)	Ekvivalent kisika (mg/l)	—			
(iv)	Koncentracija nitrita (mg N/l)				
(v)	Sprememba koncentracije nitrita (mg N/l)	—			
(vi)	Ekvivalent kisika (mg/l)	—			
(iii + vi)	Skupni ekvivlent kisika (mg/l)	—			

7. **PORABA DO: % RAZGRADNJE**

	Poraba po n dneh (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
STEKLENICA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
STEKLENICA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Poraba po n dneh (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
STEKLENICA 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{Konc. preskusne snovi} \times \text{TPK snovi}}$				
STEKLENICA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{Konc. preskusne snovi} \times \text{TPK snovi}}$				
strednja vrednost % D ([1]) $= \frac{D_1 + D_2}{2}$				

([1]) Srednje vrednosti ne računamo, če je razlika med ponovitvama zelo velika.

mt_0 = vrednost v preskusni steklenici ob času 0

mt_x = vrednost v preskusni steklenici ob času x

m_{bo} = srednja vrednost slepega vzorca ob času 0

m_{bx} = srednja vrednost slepega vzorca ob času x

Upoštevamo tudi popravek za nitrifikacijo iz (iii) + (vi) v oddelku 6.

8. **PORABA DO V SLEPEM VZORCU**

Poraba kisika v slepem vzorcu: ($m_{b0} - m_{b28}$) mg/l. Ta poraba je pomembna za veljavnost preskusa. Mora biti manj kot 1,5 mg/l.

DEL VII **PRESKUS M.I.T.I.** (MetodA C.4-F)

VII.1 PRINCIP METODE

V obdobju 28 dni se avtomatsko meri sprejem kisika v raztopini ali suspenziji preskusne snovi v mineralnem mediju, inokulirani s posebej gojenimi, neprilagojenimi mikroorganizmi, med stalnim mešanjem v zatemnjenem, zaprtem respirometru pri 25 ± 1 °C. Razviti ogljikov dioksid se absorbira v zmesi natrijevega in kalcijevega hidroksida. Biorazgradljivost se izrazi kot odstotek sprejema kisika (popravljenega glede na sprejem v slepem vzorcu) glede na teoretični sprejem (TPK). Lahko se izračuna tudi odstotek primarne biorazgradnje iz dopolnilne specifične kemične analize, opravljene na začetku in na koncu inkubacije, ter, neobvezno, z analizo DOC.

VII.2 OPIS METODE

VII.2.1 **Aparatura**

(a) avtomatski elektrolitski BPK-meter ali respirometer, navadno opremljen s šestimi 300 ml-steklenicami s posodicami za CO_2-absorbent;

▼B

(b) prostor s konstantno temperaturo in/ali vodna kopel s temperaturo 25 °C ± 1 °C ali bolj natančno;

(c) naprava za membransko filtracijo (neobvezno);

(d) analizator ogljika (neobvezno).

VII.2.2 **Priprava mineralnega medija**

Pripravimo naslednje osnovne raztopine iz analitsko čistih reagentov in vode (I.6.1):

(a)	Monokalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalijev monohidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatrijev monohidrogen ortofosfat dodekahidrat Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Amonijev klorid, NH_4Cl	1,70 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	
	pH vrednost raztopine mora biti 7,2.	
(b)	Magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	
(c)	Kalcijev klorid, brezvodni, $CaCl_2$	27,50 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	
(d)	Železov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Raztopimo v vodi in dopolnimo do 1 litra.	

Zmešamo po 3 ml raztopine (a), (b), (c) in (d) in dopolnimo do 1 litra.

VII.2.3 **Priprava inokuluma**

Zberemo sveže vzorce na najmanj desetih mestih, v glavnem na območjih, kjer se uporabljajo in odvajajo različne kemikalije. Na mestih kot so čistilne naprave za komunalno ali industrijsko odpadno vodo, reke, jezera, morja, zberemo 1-litrske vzorce blata, površinske prsti, vode itd. in jih dobro zmešamo skupaj. Odstranimo plavajoče delce in pustimo nekaj časa stati, nato uravnamo pH supernatanta na 7 ± 1 z natrijevim hidroksidom ali fosforno kislino.

Z ustreznim volumnom filtriranega supernatanta napolnimo posode za obdelavo aktivnega blata po sistemu polni-prazni in tekočino prezračujemo približno 23 1/2 h. Trideset minut po ustavitvi prezračevanja zavržemo približno eno tretjino celotnega volumna supernatanta ter preostanku dodamo enak volumen raztopine (pH 7), ki vsebuje po 0,1 % glukoze, peptona in monokalijevega ortofosfata, in nadaljujemo s prezračevanjem. Postopek ponovimo enkrat na dan. Enoto za blato je treba upravljati v skladu z dobro prakso: tekočina mora biti bistra, vzdrževati je treba konstantno temperaturo 25 ± 2 °C, pH mora biti 7 ± 1, blato se mora dobro posedati, prezračevanje mora biti zadostno, da je zmes ves čas aerobna, prisotne morajo biti praživali in najmanj vsake tri mesece je treba z referenčno snovjo preveriti aktivnost blata. Blata ne smemo uporabiti dokler ne preteče najmanj en mesec obdelave in ne po več kot štirih mesecih. Nato v rednih časovnih presledkih, enkrat na tri mesece, zbiramo vzorce na najmanj 10 mestih.

▼B

Za vzdrževanje enake aktivnosti svežega in starega blata zmešamo filtrirani supernatant obdelovanega aktivnega blata z enakim volumnom filtriranega supernatanta sveže zbrane mešanice iz desetih virov ter nastalo zmes kultiviramo po zgornjem postopku. Blato za inokulum odvzamemo 18–24 h po polnjenju enote.

VII.2.4 **Priprava steklenic**

Pripravimo naslednjih šest steklenic:

Št. 1: 100 mg/l preskusne snovi v vodi za redčenje

Št. 2, 3 in 4: 100 mg/l preskusne snovi v mineralnem mediju

Št. 5: 100 mg/l referenčne snovi (npr. anilin) v mineralnem mediju

Št. 6: samo mineralni medij

Slabo topne snovi dodamo neposredno na podlagi mase ali volumna ali z njimi ravnamo, kakor je opisano v Dodatku 3, ne smemo pa uporabiti ne topil ne emulgatorjev. V vse steklenice damo CO_2-absorbent v za to namenjene posodice. V steklenicah št. 2, 3 in 4 uravnamo pH na 7,0.

VII.2.5 **Izvedba preskusa**

Steklenice št. 2, 3 in 4 (preskusne suspenzije), št. 5 (kontrola aktivnosti) in št. 6 (slepi vzorec z inokulumom) inokuliramo z majhno količino inokuluma, tako da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi 30 mg/l. V steklenico št. 1, ki je namenjena abiotski kontroli, ne damo inokuluma. Sestavimo aparaturo, preverimo nepredušnost, vklopimo mešalnike in začnemo meriti sprejem kisika v temi. Dnevno preverjamo temperaturo, mešalnik in kulometrični zapisovalnik sprejema kisika ter zapišemo vse spremembe barve vsebine steklenic. Z ustrezno metodo, na primer s šestmestnim grafičnim zapisovalnikom, ki izriše krivuljo BPK, neposredno odčitavamo sprejem kisika v šestih steklenicah. Ob koncu inkubacije, navadno 28 dni, izmerimo pH vsebine steklenic ter določimo koncentracijo ostanka preskusne snovi in kakršnega koli vmesnega produkta in, pri vodotopnih snoveh, koncentracijo DOC (Dodatek 2.4). Pri hlapnih snoveh moramo biti posebej previdni. Če pričakujemo nitrifikacijo, po možnosti določimo koncentracijo nitrata in nitrita.

VII.3 PODATKI IN POROČANJE

VII.3.1 **Obdelava rezultatov**

Količino kisika (mg), ki ga sprejme preskusna snov po določenem času, popravljeno glede na sprejem v slepem vzorcu za kontrolo inokuluma v istem času, delimo z uporabljeno maso preskusne snovi. Tako dobimo BPK, izražen v mg kisika/mg preskusne snovi, to je:

$$\text{BPK} = \frac{(\text{mg sprejetega } O_2 \text{ pri preskusni snovi} - \text{mg sprejetega } O_2 \text{ pri slepem vzorcu})}{(\text{mg preskusne snovi v steklenici})}$$

= mg O_2 na mg preskusne snovi

▼B

Odstotek biorazgradnje se izračuna po enačbi:

$$\%\ \text{biorazgradnje} = \%\ \text{TPK} = \frac{\text{BPK}(\text{mg } O_2/\text{mg snovi})}{\text{TPK}(\text{mg } O_2/\text{mg snovi})} \times 100$$

Pri zmeseh izračunamo TPK iz elementarne analize, kakor pri enostavnih spojinah. Uporabimo ustrezni TPK (TPK_{NH4} ali TPK_{NO3}), glede na to ali nitrifikacije ni ali je popolna (Dodatek 2.2). Če pa pride do nitrifikacije, vendar je nepopolna, izračunamo popravek za kisik, porabljen pri nitrifikaciji, iz sprememb v koncentraciji nitrita in nitrata (Dodatek 5).

Odstotek primarne biorazgradnje izračunamo iz izgube specifične (izhodne) snovi (glej 1.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Če je v steklenici št. 1, namenjeni merjenju fizikalno-kemijske odstranitve, prišlo do izgube preskusne snovi, to navedemo v poročilu in uporabimo koncentracijo preskusne snovi (S_b) po 28 dneh v tej steklenici za izračun odstotka biorazgradnje.

Kadar določamo DOC (neobvezno), izračunamo odstotek popolne biorazgradnje po enačbi:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

kakor je opisano v točki I.7.1. Če je v steklenici št. 1, namenjeni merjenju fizikalno-kemijske odstranitve, prišlo do izgube DOC, uporabimo koncentracijo DOC v tej steklenici za izračun odstotka biorazgradnje.

Vse rezultate zapišemo na priložene podatkovne liste.

VII.3.2 **Veljavnost rezultatov**

Sprejem kisika v slepem vzorcu z inokulumom je navadno 20–30 mg O_2/l in ne sme biti večji od 60 mg/l v 28 dneh. Pri vrednostih nad 60 mg/l je treba kritično preveriti podatke in tehniko preskušanja. Če je pH vrednost izven območja 6–8,5 in poraba kisika pri preskusni snovi pod 60 %, je treba preskus ponoviti z manjšo koncentracijo preskusne snovi.

Glej tudi 1.5.2.

Če odstotek razgradnje anilina, izračunan iz porabe kisika, ne preseže 40 % po 7 dneh in 65 % po 14 dneh, se preskus šteje za neveljavnega.

VII.3.3 **Poročanje**

Glej 1.8.

VII.4 PODATKOVNI LIST

V nadaljevanju je predstavljen primer podatkovnega lista.

PRESKUS M.I.T.I. (I)

1. **LABORATORIJ**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA**

▼B

3. **PRESKUSNA SNOV**

Ime:

Koncentracija osnovne raztopine: ... mg/l kot snov

Začetna koncentracija v mediju, C_o: ... mg/l kot snov

Volumen reakcijske zmesi, V: .. ml

TPK: ... mg O_2/l

4. **INOKULUM**

Mesta vzorčenja blata:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Koncentracija neraztopljenih trdnih snovi v aktivnem blatu po aklimatizaciji s sintetičnim blatom = ... mg/l

Volumen aktivnega blata na liter končnega medija = ... ml

Koncentracija blata v končnem mediju = ... mg/l

5. **SPREJEM KISIKA: BIORAZGRADLJIVOST**

Vrsta uporabljenega respirometra:

			Čas (dan)				
			0	7	14	21	28
Spr. O_2 (mg) preskusna snov	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spr. O_2 (mg) slepi vzorec	b						
Popravljeni spr. O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b_1)$ $(a_3 - b_1)$						
BPK na mg preskusne snovi	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Steklenica 1					
		Steklenica 2					
		Steklenica 3					
% razgradnje $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		srednja vrednost ([1])					

([1]) Srednje vrednosti ne računamo, če je razlika med panovitvanna zelo velika.

▼B

Opomba: Za referenčno, snov se lahko uporabi padobna oblika.

6. **ANALIZA OGLIJIKA** (neobvezno)**:**

Analizator ogljika:

Steklenica	DOC				% odstranjenega DOC	Srednja vrednost
	Izmerjeni		Popravljeni			
Voda + preskusna snov	a				—	—
Blato + preskusna snov	b_1		$b_1 - c$			
Blato + preskusna snov	b_2		$b_2 - c$			
Blato + preskusna snov	b_3		$b_3 - c$			
Slepi kontrolni vzorec	c		—		—	—

$$\% \text{ odstranjenega DOC} : \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **PODATKI SPECIFIČNE KEMIČNE ANALIZE**

	Kabčina ostamka preskusne snovi ob koncu preskusa	% razgradnje
Slepi preskus z vodo	S_b	
Inokulirani medij	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ razgradnje} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Izračunamo % razgradnje za steklenice a_1, a_2, a_3.

8. **OPOMBE**

Priložiti je treba krivuljo BPK v odvisnosti od časa, če je na voljo.

▼B

DODATEK 1

OKRAJŠAVE IN OPREDELITEV POJMOV

DO: Raztopljeni kisik (mg/l) je koncentracija kisika, raztopljenega v vodnem vzorcu (dissolved oxygen).

BPK: Biokemijska potreba po kisiku (g) je količina kisika, ki ga porabijo mikroorganizmi pri presnavljanju preskusne snovi; izražena tudi v g sprejetega kisika na g preskusne snovi. (Glej metodo C.5).

KPK: Kemijska potreba po kisiku (g) je količina kisika, porabljenega pri oksidaciji preskusne snovi z vročim, kislim dikromatom; predstavlja mero količine prisotne oksidirajoče snovi; izražena tudi v g porabljenega kisika na g preskusne snovi. (Glej metodo C.6).

DOC: Raztopljeni organski ogljik (dissolved organic carbon) je organski ogljik, ki je prisoten v raztopini ali gre skozi 0,45-mikrometrski filter ali ostane v supernatantu po 15-minutnem centrifugiranju pri 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g).

TPK: Teoretična potreba po kisiku (mg) je skupna količina kisika, potrebna za popolno oksidacijo snovi; izračuna se iz molekulske formule (glej Dodatek 2.2) in se izrazi tudi v mg kisika, potrebnega za mg preskusne snovi.

TCO_2: Teoretični ogljikov dioksid (mg) je količina ogljikovega dioksida, izračunana iz znane ali izmerjene vsebnosti ogljika v preskusni snovi, ki se proizvede ob popolni mineralizaciji snovi; izražena tudi v mg ogljikovega dioksida, razvitega na mg preskusne snovi.

TOC: Skupni organski ogljik vzorca je vsota organskega ogljika v raztopini in suspenziji (total organic carbon).

IC: Anorganski ogljik (inorganic carbon).

TC: Skupni ogljik je vsota organskega in anorganskega ogljika v vzorcu (total carbon).

Primarna biorazgradnja:

je sprememba kemične strukture snovi, ki jo povzroči biološko delovanje, zaradi česar snov zgubi posebne lastnosti.

Popolna biorazgradnja (aerobna):

je raven biorazgradnje, ki se doseže, ko mikroorganizmi povsem porabijo preskusno snov, pri čemer nastane ogljikov dioksid, voda, mineralne soli in nove mikrobne celične sestavine (biomasa).

Dobro biorazgradljivo:

je arbitrarna razvrstitev snovi, ki so prestale nekatere specifične presejalne preskuse za popolno biorazgradljivost; ker so ti preskusi dovolj strogi, se predpostavlja, da se bodo take snovi v vodnem okolju in aerobnih pogojih hitro in povsem biorazgradile.

▼B

Inherentno biorazgradljivo:

razvrstitev snovi, za katere obstajajo nedvoumni dokazi o biorazgradljivosti (primarni ali popolni) iz katerega koli priznanega preskusa biorazgradljivosti.

Možnost čiščenja:

je voljnost snovi za odstranitev med biološkim čiščenjem odpadnih vod, ne da bi to škodovalo normalnemu delovanju čistilnih procesov. Na splošno se dobro biorazgradljive snovi lahko čistijo, ne pa tudi vse inherentno biorazgradljive snovi. Lahko delujejo tudi abiotski procesi.

Čas prilagajanja (lag faza):

je pri preskusu upadanja čas, ki preteče od inokulacije do razgradnje najmanj 10 %. Čas prilagajanja je pogosto zelo spremenljiv in slabo obnovljiv.

Čas razgradnje:

je čas od konca časa prilagajanja do trenutka, ko se doseže 90 % največje ravni razgradnje.

10-dnevno okno:

je obdobje 10 dni, ki se začne takoj, ko se doseže 10-odstotna razgradnja.

▼B

DODATEK 2

IZRAČUN IN DOLOČITEV PRIMERNIH ZBIRNIH PARAMETROV

Odvisno od izbrane metode bodo potrebni nekateri zbirni parametri. V naslednjem oddelku je opisana izpeljava teh vrednosti. Uporaba teh parametrov je opisana v posameznih metodah.

1. **Vsebnost ogljika**

Vsebnost ogljika se izračuna iz znane ali z elementarno analizo določene elementarne sestave preskusne snovi.

2. **Teoretična potreba po kisiku (TPK)**

Teoretična potreba po kisiku (TPK) se lahko izračuna, če je znana ali je bila z elementarno analizo določena elementarna sestava. Za spojino:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

brez nitrifikacije je

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW}\ mg/mg$$

ali z nitrifikacijo

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemijska potreba po kisiku (KPK)**

Kemijska potreba po kisiku (KPK) se določi po metodi C.6.

4. **Raztopljeni organski ogljik (DOC)**

Raztopljeni organski ogljik (DOC) je po opredelitvi organski ogljik katere koli snovi ali zmesi v vodi, ki gre skozi 0,45-mikrometrski filter.

Iz preskusnih posod vzamemo vzorce in jih takoj filtriramo v filtrirni napravi z uporabo ustreznega membranskega filtra. Prvih 20 ml (kadar uporabimo majhen filter, se ta količina lahko zmanjša) filtrata zavržemo. Za analizo ogljika obdržimo 10–20 ml, kadar injiciramo, lahko tudi manj (volumen odvisen od količine, potrebne za analizator ogljika). Koncentracija DOC se določi z analizatorjem organskega ogljika, ki lahko točno izmeri koncentracijo ogljika, enakovredno ali manjšo od 10 % začetne koncentracije DOC v preskusu.

Filtrirane vzorce, ki jih ne moremo analizirati isti dan, lahko konzerviramo tako, da jih shranimo v hladilniku pri temperaturi 2–4 °C za 48 h ali pod –18 °C za dlje časa.

Opombe:

Membranski filtri so pogosto impregnirani s površinsko aktivnimi snovmi, da postanejo hidrofilni. Tak filter lahko vsebuje več mg topnega organskega ogljika, ki moti določanje biorazgradljivosti. Površinsko aktivne snovi in druge topne organske spojine se s filtrov odstranijo tako, da se filtri trikrat po eno uro kuhajo v vreli deionizirani vodi. Filtri se nato lahko shranijo v vodi za en teden. Če se uporabijo filtrirni vložki za enkratno uporabo, je treba vsako serijo preveriti, ali ne sprošča topnega organskega ogljika.

▼B

Odvisno od vrste membranskega filtra se lahko nanj adsorbira preskusna snov. Zato je priporočljivo zagotoviti, da se preskusna snov ne zadrži na filtru.

Namesto filtracije se za določanje razlike med TOC in DOC uporabi 15-minutno centrifugiranje pri 40 000 m sec^{-2} (4 000 g). Metoda ni zanesljiva pri začetni koncentraciji < 10 mg DOC/l, saj se bodisi ne odstranijo vse bakterije bodisi se ogljik kot del bakterijske plazme ponovno raztopi.

LITERATURA

— (1) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, str. 65.

— (2) Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46,139.

— (3) DIN-Entwurf 38409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— (4) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

▼B

DODATEK 3

VREDNOTENJE BIORAZGRADLJIVOSTI SLABO TOPNIH SNOVI

Pri preskusih biorazgradljivosti s slabo topnimi snovmi, je treba posebno pozornost posvetiti naslednjim vidikom.

Homogene tekočine bodo redko povzročale težave pri vzorčenju, trdne materiale pa je priporočljivo homogenizirati z ustreznimi sredstvi, da se preprečijo napake zaradi nehomogenosti. Posebej previdni moramo biti, kadar potrebujemo reprezentativne vzorce nekaj miligramov zmesi snovi ali snovi z veliko vsebnostjo nečistot.

Lahko se uporabijo različni načini mešanja med preskusom. Biti moramo previdni, da mešanje ravno zadostuje za dispergiranje snovi, ne povzroči pa pregrevanja, prekomernega penjenja in prekomernih strižnih sil.

Lahko se uporabi emulgator, ki daje stabilne disperzije snovi. Ne sme biti strupen za bakterije in ne sme se biorazgraditi ali povzročiti penjenja v pogojih preskusa.

Za topila veljajo enaka merila, kakor za emulgatorje.

Ni priporočljivo uporabljati trdnih nosilcev za trdne preskusne snovi, so pa lahko primerni za oljaste snovi.

Kadar se uporabijo pomožne snovi, kot so emulgatorji, topila in nosilci, je treba izvesti preskus na slepem vzorcu, ki vsebuje pomožno snov.

Za preučevanje biorazgradljivosti slabo topnih snovi se lahko uporabi kateri koli od treh respirometričnih preskusov: CO_2, BPK, MITI.

LITERATURA

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

DODATEK 4

VREDNOTENJE BIORAZGRADLJIVOSTI SNOVI, ZA KATERE SE SUMI, DA SO STRUPENE ZA INOKULUM

Kadar se na snovi opravi preskus dobre biorazgradljivosti in je videti, da snov ni biorazgradljiva, se priporoča naslednji postopek, če je treba razlikovati med inhibicijo in inertnostjo (Reynolds et al., 1987).

Za preskuse strupenosti in biorazgradljivosti je treba uporabiti podobne ali enake inokulume.

Za oceno strupenosti snovi, preučevanih v preskusih biorazgradljivosti, se zdi primerno uporabiti eno od metod inhibicije stopnje respiracije blata (preskus inhibicije respiracije aktivnega blata – Direktiva 88/302/EGS), BPK in/ali metod inhibicije rasti oziroma kombinacijo teh metod.

Če je treba preprečiti inhibicijo zaradi strupenosti, je priporočljivo pri preskušanju dobre biorazgradljivosti uporabiti koncentracije preskusne snovi, ki so manjše od 1/10 vrednosti EC_{50} (ali manjše od vrednosti EC_{20}), dobljenih pri preskušanju strupenosti. Snovi z vrednostjo EC_{50} nad 300 mg/l, verjetno ne bodo imele strupenega učinka pri preskušanju dobre biorazgradljivosti.

Vrednosti EC_{50}, manjše od 20 mg/l, bodo verjetno predstavljale resen problem pri nadaljnjem preskušanju. Treba je uporabiti majhne koncentracije preskusne snovi ter posledično uporabiti strog in občutljiv preskus z zaprto steklenico ali material, označen s ^{14}C. Po drugi strani lahko aklimatiziran inokulum omogoči uporabo večjih koncentracij preskusne snovi. Vendar se v tem drugem primeru izgubi specifično merilo preskusa dobre biorazgradljivosti.

LITERATURA

(1) Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

DODATEK 5

POPRAVEK SPREJEMA KISIKA ZARADI VPLIVA NITRIFIKACIJE

Napake zaradi neupoštevanja nitrifikacije pri določanju biorazgradljivosti z merjenjem sprejema kisika so pri preskusnih snoveh, ki ne vsebujejo N, zanemarljive (največ 5 %), tudi če se oksidacija amonijskega dušika kdaj pa kdaj pojavlja v preskusnih posodah in tistih s slepim vzorcem. Lahko pa nastanejo resne napake, kadar preskusna snov vsebuje N.

Če je prišlo do nitrifikacije, ki pa ni popolna, se opaženi sprejem kisika v reakcijski zmesi lahko popravi za količino kisika, porabljenega za oksidacijo amoniaka do nitrita in nitrata, če se določijo spremembe koncentracije nitrita in nitrata med inkubacijo, z upoštevanjem naslednjih enačb:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Torej:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Po enačbi (1) je količina kisika, ki jo 28 g dušika v amonijevem kloridu (NH_4Cl) porabi pri oksidaciji do nitrita, enaka 96 g, faktor je torej 3,43 (96/28). Po enačbi (3) pa je količina kisika, ki jo porabi 28 g dušika pri oksidaciji do nitrata, enaka 128 g, kar pomeni faktor 4,57 (128/28).

Ker sta reakciji zaporedni, saj potekata v ločenih in različnih bakterijskih vrstah, se koncentracija nitrita lahko poveča ali zmanjša; v drugem primeru se bo proizvedla ekvivalentna koncentracija nitrata. Količina kisika, porabljenega pri tvorbi nitrata, je torej 4,57 pomnoženo s povečanjem koncentracije nitrata, medtem ko je količina kisika, povezana z nastajanjem nitrita, enaka 3,43 pomnoženo s povečanjem koncentracije nitrita oziroma pri zmanjšanju koncentracije nitrita je izguba kisika enaka - 3,43 pomnoženo s zmanjšanjem koncentracije.

To je:

O_2, porabljen pri tvorbi nitrata = 4,57 × povečanje koncentracije nitrata (4)

in

O_2, porabljen pri tvorbi nitrita = 3,43 × povečanje koncentracije nitrita (5)

in

O_2, izgubljen pri izginjanju nitrita = - 3,43 × zmanjšanje koncentracije nitrata (6)

Tako da je

sprejem O_2 zaradi nitrifikacije = ± 3,43 × sprememba konc. nitrita + 4,57 × povečanje (7) konc. nitrata (7)

in

O_2 sprejem zaradi oksidacije C = celotni opaženi sprejem – sprejem zaradi nitrifikacije (8)

Če se določi le skupni oksidirani N, se lahko za prvi približek šteje, da je sprejem kisika zaradi nitrifikacije enak 4,57 × povečanje oksidiranega N.

Popravljena vrednost porabe kisika zaradi oksidacije C se primerja s TPK NH_3, kakor se izračuna v Dodatku 2.

▼B

C.5 RAZGRADNJA – BIOKEMIJSKA POTREBA PO KISIKU

1. METODA

1.1 UVOD

Namen te metode je izmeriti biokemijsko potrebo po kisiku (BPK) trdnih ali tekočih organskih snovi.

Podatki, pridobljeni s tem preskusom, se nanašajo na vodotopne snovi; lahko pa se, vsaj načeloma, preskušajo tudi hlapne snovi in tiste, slabo topne v vodi.

Ta metoda se uporablja samo za tiste organske preskusne snovi, ki ne zavirajo bakterij pri koncentraciji, uporabljeni pri preskusu. Če preskusna snov ni topna pri preskusni koncentraciji, bodo morda potrebni posebni ukrepi, kot je uporaba ultrazvočnega dispergiranja, da se doseže dobra disperzija preskusne snovi.

Podatki o strupenosti snovi so lahko uporabni za razlago nizkih rezultatov in za izbiro primernih preskusnih koncentracij.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

BPK je opredeljen kot masa raztopljenega kisika, potrebna za biokemijsko oksidacijo določenega volumna raztopine snovi pod predpisanimi pogoji.

Rezultati se izrazijo v gramih BPK na gram preskusne snovi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Zaželena je uporaba ustrezne referenčne snovi za preverjanje aktivnosti inokuluma.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Vnaprej določena količina snovi, raztopljene ali dispergirane v dobro prezračenem primernem mediju, se inokulira z mikroorganizmi in inkubira v temi pri konstantni določeni temperaturi okolja.

BPK se določi iz razlike v vsebnosti raztopljenega kisika na začetku in na koncu preskusa. Preskus mora trajati najmanj pet dni in največ 28 dni.

Vzporedno je treba opraviti slepi preskus z vzorcem brez preskusne snovi.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Določitev BPK se ne šteje za veljavno določitev biorazgradljivosti snovi. Ta preskus se lahko upošteva le kot presejalni preskus.

1.6 OPIS POSKUSNE METODE

Pripravi se predhodna raztopina ali disperzija snovi, tako da se dobi koncentracija BPK, ki je združljiva z uporabljeno metodo. Nato se določi BPK po kateri koli ustrezni nacionalni ali mednarodni standardizirani metodi.

▼B

2. **PODATKI IN OCENA**

BPK v predhodni raztopini se izračuna po izbrani normirani metodi in pretvori v grame BPK na gram preskusne snovi.

3. **POROČANJE**

Navede se uporabljena metoda.

Biokemijska potreba po kisiku mora biti srednja vrednost najmanj treh veljavnih meritev.

Poročati je treba o vseh informacijah in opombah, pomembnih za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot, agregatnega stanja, strupenih učinkov in notranje sestave snovi, ki bi lahko vplivale na rezultate.

Poročati je treba o uporabi dodatka za zaviranje biološke nitrifikacije.

4. **VIRI**

Seznam standardiziranih metod, na primer:

(1) NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

(2) NBN 407: Biochemical oxygen demand.

(3) NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

(4) The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

(5) ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6 RAZGRADNJA – KEMIJSKA POTREBA PO KISIKU

1. METODA

1.1 UVOD

Namen te metode je izmeriti kemijsko potrebo po kisiku (KPK) trdnih ali tekočih organskih snovi na standardni način, pod določenimi laboratorijskimi pogoji.

Za izvedbo tega preskusa in razlago dobljenih rezultatov bodo uporabne informacije o formuli snovi (npr. halogenidi, železove soli organskih spojin, organoklorove spojine).

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Kemijska potreba po kisiku je mera oksidacije snovi, izražena kot količina kisika ekvivalentna količini oksidacijskega reagenta, ki jo porabi snov pod določenimi laboratorijskimi pogoji.

Rezultat se izrazi v gramih KPK na gram preskusne snovi.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčnih snovi ni treba uporabiti vsakokrat, ko se preučuje nova snov. Predvsem naj bi se uporabljale za občasno umerjanje metode in za omogočanje primerjave rezultatov pri uporabi druge metode.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Vnaprej določena količina snovi, raztopljene ali dispergirane v vodi, se dve uri oksidira s kalijevim dikromatom v mediju s koncentrirano žveplovo kislino in s srebrovim sulfatom kot katalizatorjem pod povratnim hladilnikom. Ostanek dikromata se določi s titracijo s standardiziranim železo-amonijevim sulfatom.

Pri snoveh, ki vsebujejo klor, se doda živosrebrov sulfat ([1]) da se zmanjšanja motnja zaradi klorida.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Zaradi arbitrarnega načina določanja je KPK „indikator oksidacije“ in se kot tak uporablja kot praktični način merjenja organskih snovi.

Klorid lahko moti ta preskus; določanje KPK lahko motijo tudi anorganski reducenti ali oksidanti.

Nekatere ciklične spojine in mnoge hlapne spojine (npr. nižje maščobne kisline) se pri tem preskusu ne oksidirajo popolnoma.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

Pripravi se predhodna raztopina ali disperzija snovi, tako da se dobi KPK med 250 in 600 mg na liter.

([1]) Po uporabi je treba raztopine, ki vsebujejo živosrebrove soli, primerno obdelati, da se prepreči sproščanje živega srebra v okolje.

▼B

Opombe:

Pri snoveh, ki so slabo topne ali se jih ne da dispergirati, se lahko zatehta količina fino uprašene snovi ali tekoče snovi, ki ustreza približno 5 mg KPK, in se da v preskusno aparaturo z vodo.

Pogosto, zlasti pri slabo topnih snoveh, je kemijsko potrebo po kisiku (KPK) bolj primerno določiti po različici metode, t.j. v zaprtem sistemu z napravo za izravnavo tlaka (H. Kelkenberg, 1975). S to prilagojeno metodo se pogosto lahko uspešno kvantitativno določijo snovi, ki se s konvencionalno metodo le stežka določijo – npr. ocetna kislina. Vendar je v primeru piridina tudi ta metoda neuspešna. Če se koncentracija kalijevega dikromata, predpisana v viru (1), poveča na 0,25 N (0,0416 M), se lažje neposredno zatehta 5–10 mg snovi, kar je bistveno za določanje KPK slabo topnih snovi (vir (2)).

V drugih primerih se nato določi KPK po kateri koli ustrezni nacionalni ali mednarodni standardizirani metodi.

2. **PODATKI IN OCENA**

KPK v preskusni bučki se izračuna po izbrani normirani metodi in pretvori v grame KPK na gram preskusne snovi.

3. **POROČANJE**

Treba je navesti uporabljeno referenčno metodo.

Kemijska potreba po kisiku mora biti srednja vrednost najmanj treh meritev. Poročati je treba o vseh informacijah in opombah, pomembnih za razlago rezultatov, zlasti glede nečistot, agregatnega stanja in notranjih lastnosti snovi (če so znane), ki bi lahko vplivale na rezultate.

Treba je poročati o uporabi živosrebrovega sulfata za zmanjšanje motnje zaradi klorida.

4. **VIRI**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Seznam standardiziranih metod, na primer:

NBN T 91–201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90–101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7 RAZGRADNJA – ABIOTSKA RAZGRADNJA: HIDROLIZA KOT FUNKCIJA pH

1. METODA

Ta preskusna metoda je enakovredna OECD TG 111 (2004).

1.1 UVOD

Kemikalije lahko vstopijo v površinske vode z neposrednim vnosom, razpršenjem, razlitjem, odtekanjem, odlaganjem odpadkov, odpadnimi vodami iz industrije, gospodinjstev in kmetijstva ter odlaganjem iz atmosfere. V teh vodah se lahko pretvorijo s kemijskimi (npr. hidrolizo, oksidacijo), fotokemijskimi in/ali mikrobnimi procesi. V tej smernici je opisana laboratorijska preskusna metoda za določevanje abiotskih hidrolitskih pretvorb kemikalij v vodnih sistemih pri vrednostih pH, ki so v tem okolju običajne (pH 4–9). Ta smernica temelji na obstoječih smernicah (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

S poskusi se določi (i) hitrost hidrolize preskusne snovi kot funkcijo pH ter (ii) identiteta ali narava in stopnje nastajanja ali razpada produktov hidrolize, ki so jim lahko izpostavljeni organizmi. Te študije so lahko potrebne za kemikalije, ki se neposredno vnašajo v vode, ali kemikalije, za katere je verjetno, da lahko vstopijo v okolje po drugih poteh, ki so opisane zgoraj.

1.2 OPREDELITVE IN ENOTE

Glej Dodatek 2.

1.3 UPORABA METODE

Metoda je splošno uporabna za kemijske snovi (označene ali neoznačene), za katere je na voljo analitska metoda z zadostno natančnostjo in občutljivostjo. Uporabna je za rahlo hlapne in nehlapne spojine, ki so zadostno topne v vodi. Preskus se ne uporablja za kemikalije, ki so zelo hlapne iz vode (npr. fumigante, organska topila) in jih ni mogoče zadržati v raztopini v poskusnih pogojih tega preskusa. Preskus je težko izvesti s snovmi, ki so slabo topne v vodi (8).

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Sterilne vodne pufrske raztopine z različnimi vrednostmi pH (pH 4, 7 in 9) se obdelajo s preskusno snovjo in inkubirajo v temi v nadzorovanih laboratorijskih pogojih (pri konstantnih temperaturah). Po ustreznih časovnih intervalih se na pufrskih raztopinah izvede analiza za preskusno snov in produkte hidrolize. Če je preskusna snov označena (npr. s ^{14}C), je lažje določiti masno ravnovesje.

Ta preskusna metoda je zasnovana kot stopenjski pristop, ki je prikazan in razložen v Dodatku 1. Rezultat vsake stopnje sproži naslednjo stopnjo.

▼B

1.5 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

Za določevanje hitrosti hidrolize se lahko uporabijo neoznačena ali označena preskusna snov. Označene snovi je na splošno bolje uporabiti za preučevanje poti hidrolize in za določevanje ravnovesja mase, vendar v posebnih primerih označevanje ni absolutno potrebno. Priporočljivo je označevanje s ^{14}C, vendar se lahko uporabljajo tudi drugi izotopi, npr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Če je možno, se označi(-jo) najbolj stabilen(-lni) del(-i) molekule. Če npr. preskusna snov vsebuje en obroč, je treba označiti ta obroč; če preskusna snov vsebuje dva ali več obročev, pa se lahko opravijo ločene študije za ugotavljanje usode vsakega označenega obroča in za pridobivanje ustreznih podatkov o tvorbi produktov hidrolize. Čistost preskusne snovi mora biti najmanj 95 %.

Pred izvedbo preskusa hidrolize morajo biti na voljo naslednji podatki o preskusni snovi:

(a) topnost v vodi [Preskusna metoda A.6];

(b) topnost v organskih topilih;

(c) parni tlak [Preskusna metoda A.4] in/ali konstanta Henryjevega zakona;

(d) porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda [Preskusna metoda A.8];

(e) konstanta disociacije (pKa) [Smernica OECD 112] (9);

(f) hitrost neposredne in posredne fototransformacij e v vodi, kadar j e primerno.

Na voljo morajo biti analitske metode za številčno vrednotenje preskusne snovi ter če je ustrezno za identifikacijo in številčno vrednotenje produktov hidrolize v vodnih raztopinah (glej tudi oddelek 1.7.2).

1.6 REFERENČNE SNOVI

Po možnosti je treba uporabiti referenčne snovi za identifikacijo in številčno vrednotenje produktov hidrolize s spektroskopskimi in kromatografskimi metodami ali drugimi ustrezno občutljivimi metodami.

1.7 MERILA KAKOVOSTI

1.7.1 **Analitski izkoristek**

Analiza najmanj dvojnika pufrskih raztopin ali njihovih ekstraktov neposredno po dodatku preskusne snovi ponuja prve kazalce ponovljivosti analitske metode in enakomernosti uporabe postopka za preskusno snov. Izračun analitskih izkoristkov v kasnejših stopnjah poskusov omogočajo ustrezna masna ravnovesja (če se uporabi označena snov). Analitski izkoristki morajo biti v območju 90 % do 110 % za označene in neoznačene kemikalije (7). Če je doseganje tega območja tehnično zahtevno, je sprejemljiv analitski izkoristek 70 % za neoznačene kemikalije, vendar je za to potrebna utemeljitev.

▼B

1.7.2 **Ponovljivost in občutljivost analitske metode**

Ponovljivost analitskih metod, uporabljenih za številčno vrednotenje preskusne snovi in produktov hidrolize, je v kasnejših stopnjah možno preveriti z analizo istih pufrskih raztopin (ali njihovih ekstraktov) v dvojniku potem, ko je količina produktov hidrolize dovolj velika za številčno vrednotenje.

Analitska metoda mora biti zadostno občutljiva za številčno vrednotenje koncentracij preskusne snovi do 10 % ali manj začetne koncentracije. Če je ustrezno, morajo biti analitske metode tudi zadostno občutljive za številčno vrednotenje produktov hidrolize v 10 % ali več uporabljene koncentracije (kadar koli v študiji) vse do 25 % ali manj najvišje koncentracije.

1.7.3 **Intervali zaupanja za podatke kinetike hidrolize**

Intervale zaupanja je treba izračunati in predstaviti za vse regresijske koeficiente, konstante hitrosti, razpolovne dobe in druge parametre kinetike (npr. DT_{50}).

1.8 OPIS PRESKUSNE METODE

1.8.1 **Oprema in aparatura**

Studijo je treba izvesti v steklenih posodah (npr. epruvetah ali majhnih bučkah) v temi in sterilnih pogojih, če je potrebno, razen če predhodni podatki (npr. porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda) pokažejo, da se preskusna snov lahko veže na steklo. V teh primerih je morda treba preučiti uporabo alternativnih materialov (npr. teflon). Problem vezave na steklo je možno zmanjšati na enega ali več naslednjih načinov:

— določitev mase preskusne snovi in produktov hidrolize, vezanih na preskusno posodo,

— uporaba ultrazvočne kopeli,

— spiranje vse steklovine s topili ob vsakem vzorčenju,

— uporaba formuliranih proizvodov,

— uporaba večjih količin sotopil pri dodajanju preskusne snovi v sistem; če se uporablja sotopilo, mora biti takšno, da ne povzroči hidrolize preskusne snovi.

Običajno so za inkubacijo različnih preskusnih raztopin potrebne temperaturno nadzorovane stresalne vodne kopeli ali termostatsko nadzorovani inkubatorji.

Potrebna je običajna laboratorijska oprema, zlasti naslednja oprema

— pH-meter,

▼B

— analitski instrumenti, kot so oprema za GC, HPLC in TLC, vključno z ustreznimi sistemi detekcije za analizo radioaktivno označenih in neoznačenih snovi ali metodo obratnega redčenja izotopov,

— instrumenti za identifikacijo (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itn.),

— tekočinski scintilacijski števec,

— separacijski liji za tekočinsko-tekočinsko ekstrakcijo,

— instrumenti za koncentracijo raztopin in ekstraktov (npr. rotacijski evaporator),

— naprava za nadzorovanje temperature (npr. vodna kopel).

Kemijski reagenti so med drugim npr:

— organska topila analitske čistosti, npr. heksan, diklorometan itn.,

— scintilacijska tekočina,

— pufrske raztopine (glej oddelek 1.8.3 za podrobnosti).

Vso steklovino, analitsko čisto vodo in pufrske raztopine, uporabljene v preskusu hidrolize, je treba sterilizirati.

1.8.2 **Uporaba preskusne snovi**

Preskusna snov se vnese v obliki vodne raztopine v različne pufrske raztopine (glej Dodatek 3). Če je potrebno za zadostno raztapljanje, je za uporabo in porazdelitev preskusne snovi dovoljena uporaba majhnih količin topil, ki se mešajo z vodo (npr. acetonitril, aceton, etanol), vendar ne smejo presegati 1 % v/v. Če je treba uporabiti višje koncentracije (npr. pri slabo topnih preskusnih snoveh), se to dovoli le, kadar je mogoče dokazati, da topilo ne vpliva na hidrolizo preskusnih snovi.

Rutinska uporaba formuliranih proizvodov ni priporočljiva, saj ni možno izključiti vpliva sestavin formule na hidrolizo. Vendar je uporaba formuliranih snovi ustrezna alternativa pri slabo vodotopnih preskusnih snoveh ali snoveh, ki se vežejo na steklo (glej oddelek 1.8.1).

Uporabiti se sme ena koncentracija preskusne snovi; pri čemer njena koncentracija ne sme preseči 0,01 M ali polovice koncentracije nasičenosti (glej Dodatek 1).

▼B

1.8.3 **Pufrske raztopine**

Preskus hidrolize je treba opraviti pri vrednostih pH 4, 7 in 9. Za ta namen je treba pripraviti pufrske raztopine iz kemikalij in vode analitske čistosti. Nekaj uporabnih pufrskih sistemov je navedenih v Dodatku 3. Upoštevati je treba, da lahko uporabljeni pufrski sistem vpliva na hitrost hidrolize, zato je v teh primerih treba uporabiti drug pufrski sistem ([1]).

Vrednost pH vsake pufrske raztopine je treba preveriti s kalibriranim pH-metrom z natančnostjo najmanj 0,1 pri zahtevani temperaturi.

1.8.4 **Preskusni pogoji**

1.8.4.1 *Preskusna temperatura*

Poskuse hidrolize je treba izvajati pri konstantnih temperaturah. Zaradi ekstrapolacije je pomembno, da se temperatura vzdržuje v mejah vsaj ± 0,5 °C.

Če hidrolitsko obnašanje preskusne snovi ni znano, je treba opraviti predhodni poskus (Stopnja 1) pri temperaturi 50 °C. Preskusi kinetike v višjih stopnjah se izvajajo pri najmanj treh temperaturah (vključno s preskusom pri 50 °C), razen če je bila v preskusih Stopnje 1 ugotovljena odpornost preskusne snovi proti hidrolizi. Predlagano temperaturno območje je 10–70 °C (po možnosti z najmanj eno temperaturo pod 25 °C), kar zajema poročevalno temperaturo 25 °C in večino temperatur, ki jih srečamo na terenu.

1.8.4.2 *Svetloba in kisik*

Vse preskuse hidrolize je treba izvesti z ustrezno metodo, da se prepričijo fotolitski učinki. Izvesti je treba vse ustrezne ukrepe, da se prepreči dostop kisika (npr. 5-minutno vpihavanje mehurčkov helija, dušika ali argona pred pripravo raztopine).

1.8.4.3 *Trajanje preskusa*

Predhodni poskus mora trajati 5 dni, preskusi višjih stopenj pa se izvajajo, dokler se ne hidrolizira 90 % preskusne snovi ali 30 dni (do česar pride prej).

1.8.5 **Izvedba preskusa**

1.8.5.1 *Predhodni preskus (Stopnja 1)*

Predhodni poskus se izvede pri 50 ± 0,5 °C in vrednostih pH 4,0, 7,0 in 9,0. Če je hidroliza določena po 5 dneh ($t_{0,525°C}$ > 1 leto) manj kot 10-odstotna, se šteje, da je preskusna snov hidrolitsko stabilna in običajno ni potrebno dodatno preskušanje. Če je znano, da je snov nestabilna pri za okolje ustreznih temperaturah ([2]), ni potreben predhodni preskus. Analitska metoda mora biti dovolj natančna in občutljiva za ugotavljanje 10-odstotnega zmanjšanja začetne koncentracije preskusne snovi.

([1]) Mabey in Mill priporočata boratne ali acetatne pufre namesto fosfatnih (11).

([2]) Ti podatki lahko izvirajo iz drugih virov, kot so podatki o hidrolizi strukturno podobnih spojin iz literature ali drugih predhodnih polkvantitativnih preskusov hidrolize s preskusno snovjo z zgodnejše stopnje razvoja.

▼B

1.8.5.2 *Hidroliza nestabilnih snovi (Stopnja 2)*

Preskus višje stopnje (napredni preskus) je treba opraviti pri vrednostih pH, pri katerih je bilo v predhodnem poskusu ugotovljeno, da je preskusna snov nestabilna. Pufrske raztopine preskusne snovi je treba termostatirati pri izbranih temperaturah. Za preskušanje obnašanja prvega reda, je treba vsako reakcijsko raztopino analizirati v časovnih intervalih, ki dajo najmanj šest podatkov meritev v ustreznih razmikih med 10- in 90-odstotno hidrolizo preskusne snovi. Posamezne ponovitve preskusnih vzorcev (najmanj duplikatni vzorci v ločenih reakcijskih posodah) je treba odstraniti in vsebino analizirati ob vsakem od najmanj šestih vzorčenj (za najmanj dvanajst podatkovnih točk s ponovitvami). Uporaba enega skupnega vzorca, iz katerega se jemljejo posamezni alikvoti preskusne raztopine v vsakem intervalu vzorčenja, se šteje kot nezadostna, saj ne dopušča analize variabilnosti podatkov in lahko povzroči težave zaradi kontaminacije preskusne raztopine. Ob koncu preskusa višjih stopenj je treba opraviti preskuse potrditve sterilnosti (t.j. po 90-odstotni hidrolizi ali po 30 dneh). Če pa ni ugotovljena razgradnja (t.j. pretvorba), se šteje, da preskusi sterilnosti niso potrebni.

1.8.5.3 *Identifikacija produktov hidrolize (Stopnja 3)*

Z ustreznimi analitskimi metodami je treba identificirati vse poglavitne produkte hidrolize, vsaj tiste ki znašajo > 10 % uporabljenega odmerka.

1.8.5.4 *Izbirni preskusi*

Pri hidrolitsko nestabilni preskusni snovi je morda treba opraviti dodatne preskuse pri pH vrednostih, ki so različne od 4, 7 in 9. Npr. za fiziološke namene je morda treba opraviti preskus v bolj kislih pogojih (npr. pH 1,2) in pri eni sami fiziološko ustrezni temperaturi (37 ^{o}C).

2. **PODATKI**

Če je ustrezno, je treba količino preskusne snovi in produktov hidrolize navajati v % uporabljene začetne koncentracije in, kadar je primerno, v mg/L za vsako vzorčenje in vsako vrednost pH in preskusno temperaturo. Če je bila uporabljena označena preskusna snov, je treba navesti tudi masno ravnovesje v odstotkih uporabljene začetne koncentracije.

Narisati je treba grafično predstavitev logaritemsko pretvorjenih koncentracij preskusne snovi v odvisnosti od časa. Opredeliti je treba vse večje produkte hidrolize, vsaj tiste, ki so > 10 % uporabljenega odmerka, in izrisati logaritemsko pretvorjene koncentracije teh snovi na enak način kot za izhodiščno snov, da so prikazane njihove hitrosti nastajanja in izginjanja.

▼B

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Z uporabo ustreznega kinetičnega modela je treba natančneje določiti razpolovne dobe ali vrednosti DT_{50}. Razpolovno dobo in/ali vrednosti DT_{50} (vključno z intervali zaupanja) je treba navesti za vsak pH in temperaturo skupaj z opisom uporabljenega modela, redom kinetike in koeficientom določitve (r_2). Kadar je to primerno, je treba izračune opraviti tudi za produkte hidrolize.

V primeru študij hitrosti, opravljenih pri različnih temperaturah, je treba konstante psevdoprvega reda (k_{obs}) opisati kot funkcije temperature. Izračun mora temeljiti tako na ločitvi k_{obs} v konstanti hitrosti za kislinsko katalizirano (k_H), nevtralno ($k_{neutral}$) in bazično katalizirano hidrolizo (K_{OH}) kot na Arrheniusovi enačbi:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

pri čemer je A_i oziroma B_i regresijska konstanta iz preseka oziroma naklona najbolje prirejenih premic, k_i nastanejo pri linearni regresiji ln ki v odvisnosti od obratne vrednosti absolutne temperature v kelvinih (T). Z Arrheniusovimi odvisnostmi za kislinsko, nevtralno in bazično katalizirano hidrolizo se lahko izračunajo konstante hitrosti psevdoprvega reda in s tem razpolovne dobe za druge temperature, pri katerih neposrednega določevanja konstante hitrosti v poskusu ni možno izvesti (10).

2.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA REZULTATOV

Večina hidrolitskih reakcij navidezno sledi konstantam prvega reda in so zato razpolovne dobe neodvisne od koncentracije (glej enačbo 4 v Dodatku 2). To običajno dovoljuje uporabo laboratorijskih rezultatov določenih pri 10^{-2} do 10^{-3} M na okoljske pogoje (< 10^{-6} M) (10). Mabey in Mill (11) sta navedla več primerov dobrega ujemanja med hitrostmi hidrolize, izmerjenimi v čistih in naravnih vodah za različne kemikalije, pod pogojem, da sta bila izmerjena pH in temperatura.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati najmanj naslednje podatke:

Preskusna snov:

— splošno ime, kemijsko ime, številka CAS, strukturna formula (v kateri je naveden položaj označevalca, če je bila uporabljena radioaktivno označena snov) in zadevne fizikalno-kemijske lastnosti (glej točko 1.5),

— čistost (nečistoče) preskušene snovi,

— čistost označevalca označene kemikalije in molarna aktivnost (kadar je primerno).

▼B

— Pufrske raztopine:

— datum in podrobnosti priprave,

— uporabljeni pufri in vode,

— molarnost in pH pufrskih raztopin.

Preskusni pogoji:

— datumi izvedbe študij,

— količina uporabljene preskusne snovi,

— metode in topila (vrsta in količina), uporabljene pri uporabi preskusne snovi,

— inkubirani volumen puferirane preskusne snovi,

— opis uporabljenega inkubacij skega sistema,

— pH in temperatura med študijo,

— časi vzorčenja,

— metoda(-e) ekstrakcije,

— metode za številčno vrednotenje in identifikacijo preskusne snovi ter njenih produktov hidrolize v pufrskih raztopinah,

— število ponovitev.

Rezultati:

— ponovljivost in občutljivost uporabljene analitske metode,

— analitski izkoristki (odstotne vrednosti za veljavnost raziskave so navedene v točki 1.7.1),

— podatki za ponovitve in povprečne vrednosti v tabeli,

— masno ravnotežje med študijo in pri koncu študije (če je bila uporabljena označena preskusna snov),

— rezultati predhodnega preskusa,

— razprava o rezultatih in interpretacija rezultatov,

— vsi izvirni podatki in slike.

Naslednji podatki so potrebni le pri določevanju hitrosti hidrolize:

— grafi koncentracij v odvisnosti od časa za preskusne snovi in, kadar je primerno, za produkte hidrolize pri vsaki vrednosti pH in temperaturi,

— tabele rezultatov Arrheniusove enačbe za temperaturo 20 °C/25 °C s pH, hitrostno konstanto [h^{-1} ali dan^{-1}], razpolovno dobo ali DT_{50}, temperaturami [°C] in intervali zaupanja ter koeficienti korelacije (r^2) ali primerljivimi podatki,

— predlagane poti hidrolize.

▼B

4. **LITERATURA**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of ChemicalsNr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

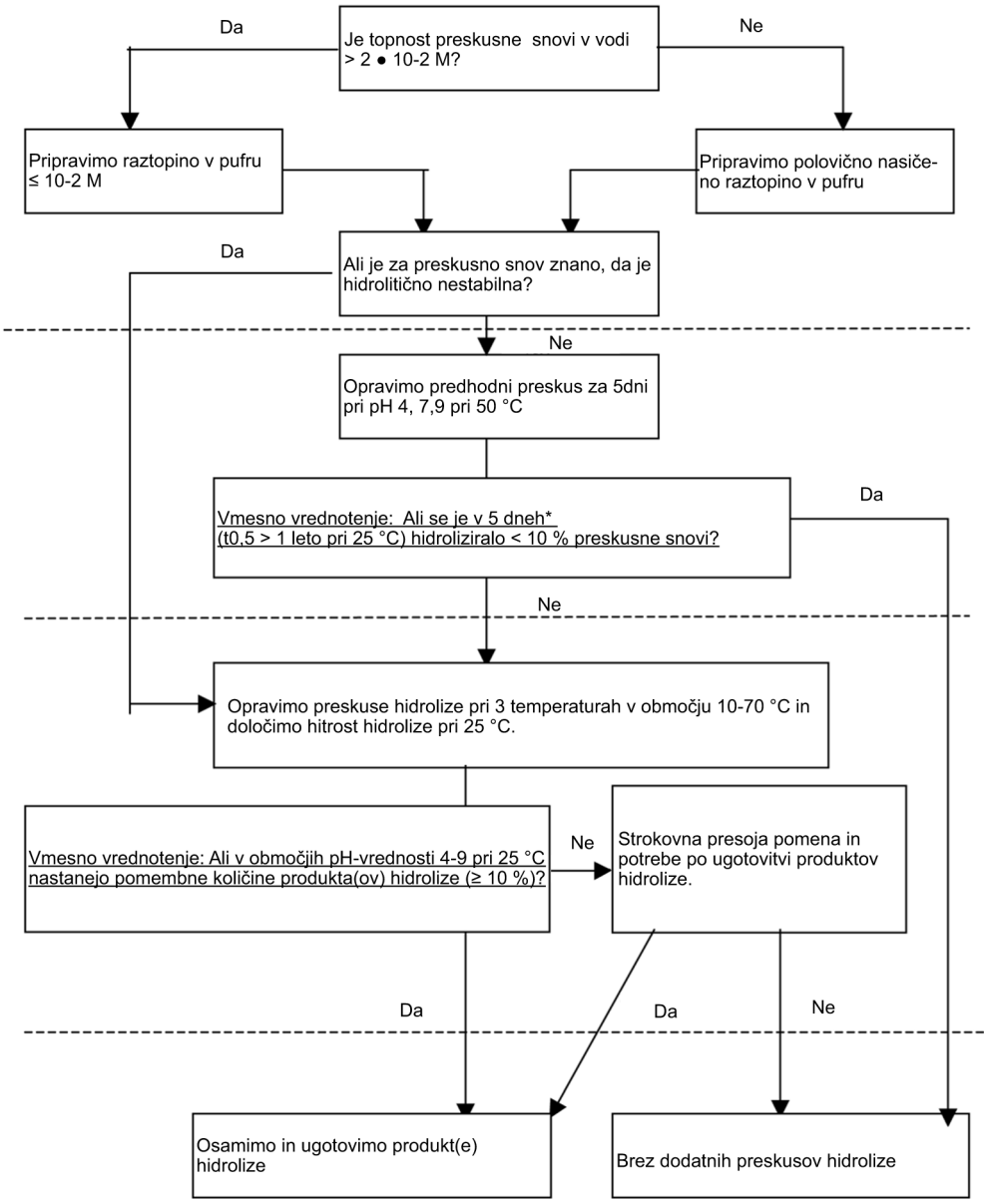
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼B

DODATEK 1

Stopenjski preskus hidrolize



* 10-odstotna hidroliza preskusne snovi pri 50 °C ustreza razpolovni dobi približno 30 dni, kar ustreza vrednosti približne 1 leto pri 25 °C.

▼B

DODATEK 2

Opredelitve in enote

V vseh primerih je treba uporabiti **standardne mednarodne enote (SI).**

Preskusna snov: vsaka snov, ki je lahko izhodiščna spojina ali ustrezen produkt pretvorbe.

Produkt pretvorbe: vse snovi, ki nastanejo zaradi biotskih ali abiotskih pretvorbenih reakcij preskusne snovi.

Produkti hidrolize: vse snovi, ki nastanejo zaradi hidrolitskih pretvorbenih reakcij preskusne snovi.

Hidroliza je reakcija preskusne snovi RX z vodo, pri kateri je v reakcijskem središču prišlo do neto zamenjave skupine X z OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Hitrost manjšanja koncentracije RX v tem poenostavljenem postopku opisuje

hitrost = $k\ [H_2O]\ [RX]$ reakcija drugega reda

ali

hitrost = $k\ [RX]$ reakcija drugega reda

odvisno od stopnje, ki omejuje hitrost. Ker količina vode znatno presega količino preskusne snovi, se ta vrsta reakcije običajno opiše kot reakcija psevdoprvega reda, pri kateri konstanto opazovane hitrosti določa razmerje

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

in se lahko določi po enačbi (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

pri čemer je

t = čas

in C_0, C_t = koncentraciji snovi (RX) ob času 0 in t.

Enota te konstante je $(čas)^{-1}$ in razpolovna doba (čas, potreben za reagiranje 50 % preskusne snovi) je

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Razpolovna doba: ($t_{0,5}$) je čas, potreben za 50-odstotno nidrolizo preskusne snovi, ce lahko reakcijo opišemo s kinetiko prvega reda: ni odvisna od koncentracije.

(*) Če grafična predstavitev logaritemsko pretvorjenih podatkov v odvisnosti od časa ne kaže linearne funkcije (izenačene s stopnjo reakcije prvega reda), uporaba enačbe [3] ni ustrezna za določanje konstante hitrosti hidrolize preskusne snovi.

▼B

DT_{50} (Čas razpada 50): je čas, v katerem se koncentracija preskusne snovi zniža za 50 %; se razlikuje od razpolovne dobe $t_{0,5}$, če reakcija ne sledi kinetiki prvega reda.

Ocena k pri različnih temperaturah

Kadar je konstanta hitrosti znana za dve temperaturi, lahko konstante hitrosti pri drugih hitrostih izračunamo z Arrheniusovo enačbo:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ ali } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Graf ln k v odvisnosti od l/T je ravna črta z naklonom –E/R

pri čemer je:

k = konstanta hitrosti, izmerjena pri različnih temperaturah

E = aktivacijska energija [kJ/mol]

T = absolutna temperatura [K]

R = plinska konstanta [8,314 J/mol.K]

Aktivacijska energija je bila izračunana z regresijsko analizo ali naslednjo enačbo:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

pri čemer je: $T_2 > T_1$.

▼B

DODATEK 3

Pufrski sistemi

A. **CLARK IN LUBS:**

Pufrske zmesi po CLARKU in LUBSU ([1])

Sestava	pH
0,2 N HCl IN 0,2 N KCl PRI 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl razredč. do 100 ml	2,2
0,1 M kalijevega biftalata + 0,1 N HCl pri 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalata do 100 ml	3,8
0,1 M kalijev biftalat + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	4,8

([1]) Vrednosti pH v teh tabelah so bile izračunane iz potencialnih meritev s Sorensenovimi standardnimi enačbami (1909). Ustrezne vrednosti pH so 0,04 enote višje od vrednosti iz preglednice.

▼B

Sestava	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalata do 100 ml	6,0

Pufrske zmesi po CLARKU in LUBSU (nadaljevanje)

0,1 M monokalijev fosfat + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfata do 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borove kisline do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF IN VLEESCHHOUWER:**

Citratni pufri po KOLTHOFFU in VLEESCHHOUWERJU

Sestava	pH
0,1 M monokalijev citrat in 0,1 N HCl pri 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrata do 100 ml	3,6
0,1 M monokalijev citrat in 0,1 N NaOH pri 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrata do 100 ml	6,0

(*) Dodati droben kristal timola ali podobne snovi, da se prepreči rast plesni.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Zmesi borata po SÖRENSENU

Sestava		Sörensen 18 °C	Walbum, pH pri		
ml boraksa	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraks + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M boraks + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Zmesi fosfata po SÖRENSEN-u

Sestava	pH
0,0667 M monokalijev fosfat + 0,0667 M dinatrijev fosfat pri 20 °C	
99,2 ml. KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml. KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml. KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml. KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml. KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml. KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml. KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml. KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml. KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml. KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml. KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml. KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml. KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml. KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml. KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml. KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 STRUPENOST ZA DEŽEVNIKE

PRESKUS NA UMETNIH TLEH

1. **METODA**

1.1 UVOD

Pri tem laboratorijskem preskusu se preskusna snov doda umetnim tlem, v katera se dajo deževniki za 14 dni. Po tem obdobju (in poljubno po sedmih dneh), se pregleda smrtni učinek snovi na deževnike. Preskus ponuja metodo za relativno kratkotrajen pregled učinkov kemikalij na deževnike, po vnosu preko kože ali hrane.

1.2 OPREDELITEV POJMOV IN ENOTA

LC_{50}: Koncentracija snovi, za katero se ocenjuje, da v preskusnem obdobju ubije 50 % preskusnih živali.

1.3 REFERENČNA SNOV

Referenčna snov se uporablja v rednih časovnih presledkih da se prikaže, da se občutljivost preskusnega sistema ni bistveno spremenila.

Kot referenčna snov se priporoča analitsko čisti kloroacetamid.

1.4 PRINCIP PRESKUSA

Tla so spremenljiv medij, zato je treba za ta preskus uporabiti natančno opredeljena umetna ilovnata tla. Odrasli deževniki vrste *Eisenia foetida* (glej opozorilo v Dodatku) se hranijo v opredeljenih umetnih tleh tretiranih z različnimi koncentracijami preskusne snovi. Vsebina posod se raztrese na pladenj 14 dni (ali sedem dni) po začetku preskusa ter se preštejejo preživeli deževniki pri vsaki koncentraciji.

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Preskus je zasnovan tako, da je kolikor je mogoče, ponovljiv glede na preskusni substrat in organizem. Smrtnost v kontrolah na koncu preskusa ne sme presegati 10 %, sicer je preskus neveljaven.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 *Materiali*

1.6.1.1 Preskusni substrat

Kot osnovni preskusni substrat se uporabljajo opredeljena umetna tla.

(a) Osnovni substrat (odstotki veljajo za suho maso)

— 10 % šotnega maha (čim bližje pH 5,5 do 6,0 brez kakršnih koli vidnih ostankov rastlin in fino zmlet),

▼B

— 20 % gline kaolinit, po možnosti z več kot 50 % kaolinita,

— Približno 69 % industrijskega kremenovega peska (prevladujoči fini pesek z več kot 50 % delcev velikosti 0,05 do 0,2 mm). Če se snov v vodi ne dovolj dispergira, je treba imeti na voljo 10 g tega peska na preskusno posodo za poznejše mešanje s preskusno snovjo,

— Približno 1 % kalcijevega karbonata ($CaCO_3$), zdrobljenega v prah, kemijsko čistega, ki se ga doda, za zvišanje pH na 6,0± 0,5.

(b) Preskusni substrat

Preskusni substrat vsebuje osnovni substrat, preskusno snov in deionizirano vodo.

Vsebnost vode je od 25 do 42 % suhe teže osnovnega substrata. Vsebnost vode v substratu se določi z izsušitvijo vzorca do konstantne teže pri 105 °C. Glavno merilo je, da se umetna tla vlaži do točke, dokler ni stoječe vode. Paziti je treba, da se z mešanjem ustvari enakomerna porazdelitev preskusne snovi in substrata. Poročati je treba o načinu vnosa preskusne snovi v substrat.

(c) Kontrolni substrat

Kontrolni substrat vsebuje osnovni substrat in vodo. Če je uporabljeno dodatno sredstvo, mora dodatna kontrola vsebovati enako količino tega dodatnega sredstva.

1.6.1.2 Preskusne posode

Steklene posode prostornine približno enega litra (ustrezno pokrite s plastičnimi pokrovi, posodami ali plastičnim filmom z luknjami za prezračevanje), napolnjeni s količino vlažnega preskusnega ali kontrolnega substrata, ki ustreza 500 g substrata suhe teže.

1.6.2 *Preskusni pogoji*

Posode je treba hraniti v klimatskih komorah pri temperaturi 20 ± 2 °C in pod stalno svetlobo. Jakost svetlobe naj bo 400 do 800 luksov.

Preskusno obdobje traja 14 dni, smrtnost pa je mogoče oceniti tudi sedem dni po začetku preskusa.

1.6.3 *Preskusni postopek*

Preskusne koncentracije

Koncentracije preskusne snovi se izrazijo kot masa snovi na suho maso osnovnega substrata (mg/kg).

Preskus za ugotavljanje območja

Razpon koncentracij, ki povzročajo smrtnost od 0 do 100 % se lahko določi s preskusom za ugotavljanje območja, da bi dobili podatke o razponu koncentracij, ki naj bi se jih uporabilo v končnem preskusu.

▼B

Snovi je treba preskusiti pri naslednjih koncentracijah: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg snovi/kilogram preskusnega substrata (suha masa).

Če naj se opravi popoln končni preskus, lahko za preskus za ugotavljanje območja zadostuje že ena preskusna serija na koncentracijo in ena za netretirano kontrolo, pri čemer vsebuje vsaka 10 deževnikov.

Končni preskus

Rezultati preskusa za ugotavljanje območja se uporabijo, za izbor najmanj petih koncentracij v geometrijskem zaporedju, ki povzročijo smrtnost od 0 do 100 % in se ločijo med sabo za konstanten faktor, ki ni večji od 1,8.

Preskusi, pri katerih se uporablja navedena zaporedja koncentracij, naj bi omogočili čimbolj natančno določitev vrednost LC_{50} in njenih mej zaupanja.

V končnem preskusu se uporabijo najmanj štiri preskusne serije na koncentracijo in štiri netretirane kontrole, pri čemer ima vsaka po 10 deževnikov. Rezultati teh ponovitvenih serij se kažejo kot povprečje in standardna deviacija.

Kadar dve zaporedni koncentraciji v razmerju 1,8 povzročita le 0 % in 100 % smrtnost, t_i dve vrednosti zadostujeta za določitev razpona, znotraj katerega leži LC_{50}.

Mešanica osnovnega preskusnega substrata in preskusne snovi

Preskusni substrat naj bo, kadar je mogoče, pripravljen brez dodajanja dodatnih sredstev, razen vode. Tik pred začetkom preskusa se emulzija ali disperzija preskusne snovi v deionizirani vodi ali drugem topilu zmeša z osnovnim preskusnim substratom ali pa se enakomerno razprši s finim kromatografskim ali drugim podobnim razpršilom.

Če preskusna snov v vodi ni topna, se lahko raztopi v čim manjši količini ustreznega organskega topila (npr. heksan, aceton ali kloroform).

Za raztapljanje, razpršitev ali emulgiranje preskusne snovi se lahko uporabijo samo tista sredstva, ki hitro izhlapijo. Preskusni substrat je treba pred uporabo prezračiti. Količino izparele vode je treba nadoknaditi. Kontrola mora vsebovati enako količino vsakega dodatnega sredstva.

Če preskusne snovi ni mogoče raztopiti, razpršiti ali emulgirati v organskih topilih, se 10 g mešanice fino zdrobljenega kremenovega peska in količine preskusne snovi, ki je potrebna za tretiranje 500 g suhe teže umetnih tal, zmeša s 490 g suhe teže preskusnega substrata.

Za vsako preskusno serijo se količina vlažnega preskusnega substrata, ki ustreza 500 g suhe teže, postavi v steklene posode, na preskusni substrat pa se položi 10 deževnikov, ki so bili 24 ur kondicionirani v podobnem vlažnem osnovnem substratu, nato pa hitro oprani in posušeni s pomočjo v filtrirnega papirja.

▼B

Posode se pokrijejo s preluknjanimi plastičnimi pokrovi, posodami ali filmom, da se prepreči izsuševanje substrata, nakar se jih za 14 dni izpostavi preskusnim pogojem.

Ocene je treba opraviti 14 dni (ali sedem dni) po začetku preskusa. Substrat se raztrese na ploščo iz stekla ali nerjavečega jekla. Pregledajo se deževniki in določi se število preživelih deževnikov. Deževniki veljajo za mrtve, če se ne odzivajo na nežni mehanični stimulus na sprednjem koncu.

Kadar se pregled opravi po sedmih dneh, se posode ponovno napolnijo s substratom, preživeli deževniki pa se ponovno položijo na isti preskusni substrat.

1.6.4 *Preskusni organizmi*

Preskusni organizmi naj bodo odrasli osebki vrste *Eisenia foetida* (glej opozorilo v Dodatku) (stari najmanj dva meseca in s klitelumom) 300 do 600 mg mokre teže. (Za metodo razmnoževanja glej Dodatek).

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA IN OCENA REZULTATOV

Koncentracije snovi se poročajo z navedbo ustreznih odstotkov mrtvih deževnikov.

Kadar so podatki ustrezni, je treba vrednost LC_{50} vain meje zaupanja ($p = 0,05$) določiti z uporabo standardnih metod (Litchfield in Wilcoxon, 1949, za ustrezno metodo). LC_{50} je treba podati kot mg preskusne snovi na kilogram preskusnega substrata (suha masa).

V tistih primerih, kjer je nagib krivulje koncentracij prestrm, da bi omogočal izračun LC_{50}, zadostuje že grafična določitev te vrednosti.

Kadar dve zaporedni koncentraciji v razmerju 1,8 povzročita le 0 % in 100 % smrtnost, t_i dve vrednosti zadostujeta za določitev razpona, znotraj katerega leži LC_{50}.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— izjava, da je bil preskus opravljen v skladu z zgoraj navedenimi merili kakovosti,

— opravljeni preskus (preskus za ugotavljanje območja in/ali končni preskus),

— natančen opis preskusnih pogojev ali izjava, da je bil preskus opravljen v skladu z metodo; poročati je treba o vseh morebitnih odstopanj,

— natančen opis, kako se je preskusno snov vmešalo v osnovni preskusni substrat,

— podatki o preskusnih organizmih (vrsta, starost, srednja vrednost in razpon v teži, pogoji vzdrževanja in razmnoževanja, dobavitelj),

▼B

— uporabljena metoda za določitev LC_{50},

— rezultati preskusa vključno z vsemi uporabljenimi podatki,

— opis opaženih simptomov ali vedenjskih sprememb pri preskusnih organizmih,

— smrtnost v kontrolah,

— LC_{50} ali najvišja preskusna koncentracija brez smrtnosti in najnižja preskusna koncentracija s 100 % smrtnostjo, 14 dni (ali sedem dni) po začetku preskusa,

— prikaz krivulje koncentracija/odziv,

— rezultati, dobljeni s preskusno snovjo, bodisi v povezavi s dotičnim preskusom bodisi iz predhodnih preskusov kontrole kakovosti.

4. **VIRI**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Edwards, C. A. in Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, str. 331.

(3) Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systématique, Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.

(4) Litchfield, J. T. in Wilcoxon, F. A simplified method of evaluation dose effect experiments. J. Pharm. Exp. Therap., zv. 96, 1949, str. 99.

(5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbunden/Biologische Bundesanstalt fur Land- un Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitatstest am Regenwurm Eisenia foetida in kiinstlichem Boden“, v: Rudolph/Boje, Okotoxologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Dodatek

Razmnoževanje in vzdrževanje deževnikov pred preskusom

Za namen razmnoževanja se 30 do 50 odraslih deževnikov postavi v škatlo za razmnoževanje s svežim substratom in se odstrani po 14. dneh. Te živali se lahko uporabijo za nadaljnje razmnoževalne serije. Deževniki, ki se izležejo iz kokonov se, ko so zreli, uporabijo za preskušanje (pod predpisanimi pogoji po dveh ali treh mesecih).

Pogoji vzdrževanja in razmnoževanja

Klimatska komora:	temperatura 20 ± 2 °C, po možnosti pod stalno svetlobo (jakost svetlobe 400 do 800 luksov).
Škatle za razmnoževanje:	ustrezne plitve posode prostornine 10 do 20 l.
Substrat:	Vrsta *Eisenia foetida* se lahko razmnožuje v različnih živalskih iztrebkih. Kot razmnoževalni medij je priporočljiva uporaba mešanice, ki jo do 50 % po prostornini sestavlja šota, 50 % pa kravji ali konjski gnoj. pH vrednost medija mora biti 6 do 7 (uravnavano s kalcijevim karbonatom) in z nizko ionsko prevodnostjo (manj kot 6 mmho ali 0,5 % koncentracije soli). Substrat mora biti vlažen, vendar ne preveč moker. Poleg zgoraj navedene metode je mogoče uporabiti tudi druge uspešne postopke.

Opomba: *Eisenia foetida* obstaja v dveh rasah, ki so ju nekateri taksonomi ločili v vrste (Bouche, 1972). Te so morfološko podobne, vendar so za vrsto *Eisenia foetida foetida* značilne prečne črte ali obroči na nekaterih predelih, medtem ko druga, *Eisenia foetida andrei,* tega nima in je bolj pisane rdečkaste barve. Kadar je mogoče, je treba uporabiti vrsto *Eisenia foetida andrei.* Drugo vrsto je mogoče uporabiti, če je na voljo potrebna metodologija.

▼B

C.9 **BIORAZGRADNJA**

ZAHN-WELLENSOV PRESKUS

1. **METODA**

1.1 UVOD

Namen te metode je ocena možne končne biorazgradljivosti vodotopnih, nehlapljivih organskih snovi, ko so v statičnem preskusu izpostavljene relativno visokim koncentracijam mikroorganizmom.

Pri tem lahko pride do fizikalno-kemijske adsorbcije na suspendiranih trdnih delcih, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov (glej 3.2).

Snovi, ki se bodo preučevale, se uporabijo v koncentracijah, ki ustrezajo vrednostim DOC v razponu od 50 do 400 mg/liter, ali vrednostim KPK v razponu od 100 do 1 000 mg/liter (DOC = raztopljeni organski ogljik; KPK = kemijska potreba po kisiku). Prednost teh relativno visokih koncentracij je analitska zanesljivost. Spojine s strupenimi lastnostmi lahko odložijo ali zavrejo proces razgradnje.

Pri tej metodi se merjenje koncentracije raztopljenega organskega ogljika ali kemijske potrebe po kisiku uporablja za oceno končne biorazgradljivosti preskusne snovi.

Istočasna uporaba specifične analitske metode lahko omogoči oceno primarne biorazgradnje snovi (izginotje matične kemijske strukture).

Metoda se uporablja le za tiste organske preskusne snovi, ki pri koncentraciji, uporabljeni v preskusu:

— so topne v vodi pod preskusnimi pogoji,

— imajo zanemarljiv parni tlak pod preskusnimi pogoji,

— ne zavirajo bakterij,

— se v preskusnem sistemu adsorbirajo le v omejenih razsežnostih,

— se ne izgubijo iz preskusne raztopine s penjenjem.

Podatki o relativnih deležih glavnih sestavin preskusnega materiala bodo uporabni pri razlagi dobljenih rezultatov, zlasti v primerih, kadar so ti rezultati nizki ali zanemarljivi.

Podatki o strupenosti snovi za mikroorganizme so zaželeni pri razlagi nizkih rezultatov in pri izbiranju ustreznih preskusnih koncentracij.

▼B

1.2 OPREDELITVE POJMOV IN ENOTE

Obseg razgradljivosti, dosežen na koncu preskusa, se navede kot „Biorazgradljivost v Zahn-Wellensovem preskusu“:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

pri čemer je:

DT = biorazgradnja (%) v času T,

CA = vrednosti DOC (ali KPK) v preskusni mešanici, izmerjene tri ure po začetku preskusa (mg/l) (DOC = raztopljeni organski ogljik, KPK = kemijska potreba po kisiku),

CT = vrednosti DOC ali KPK v preskusni mešanici v času vzorčenja (mg/l),

CB = vrednosti DOC ali KPK negativne kontrole v času vzorčenja (mg/l),

CBA = vrednosti DOC ali KPK negativne kontrole, izmerjene tri ure po začetku preskusa (mg/l).

Obseg razgradljivosti se zaokroži na najbližji celi odstotek.

Odstotek razgradnje se navede kot odstotek odstranitve DOC (ali KPK) preskusne snovi.

Razlika med izmerjeno vrednostjo po treh urah in izračunano ali, po možnosti, izmerjeno začetno vrednostjo lahko da uporabne podatke o odstranitvi snovi (glej 3.2, Razlaga rezultatov).

1.3 REFERENČNE SNOVI

V nekaterih primerih, kadar se preiskujejo nove snovi, so referenčne snovi lahko uporabne; vendar pa posebej določene referenčne snovi še ni mogoče priporočiti.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

V eno do štiri litrsko stekleno posodo opremljeno s mešalom in prezračevalom se skupaj vnese aktivno blato, mineralne hranilne snovi in preskusni material kot edini vir ogljika v vodni raztopini. Zmes se meša in prezračuje pri 20 do 25 °C pod razpršeno svetlobo ali v temnem prostoru do 28 dni. Potek razgradnje se spremlja z določanjem vrednosti DOC (ali KPK) v filtrirani raztopini dnevno ali v drugih ustreznih rednih časovnih presledkih. Razmerje med izločenim DOC (ali KPK) po vsakem časovnem presledku in vrednostjo tri ure po začetku, se prikaže kot odstotek biorazgradnje in služi kot merilo obsega razgradnje v tem času. Rezultat se prikaže v odvisnosti od časa, da se dobi krivulja biorazgradnje.

Kadar je uporabljena specifična analitska metoda, se lahko izmerijo spremembe v koncentraciji matične molekule, ki so posledica biorazgradnje (primarna biorazgradljivost).

▼B

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Ponovljivost tega preskusa je bila dokazana v krožnem preskusu.

Občutljivost metode se na splošno določi s spremenljivostjo negativne kontrole in, v manjši meri, z natančnostjo s katero je mogoče določiti raztopljen organski ogljik in količino preskusne spojine v raztopini.

1.6 OPIS PRESKUSNEGA POSTOPKA

1.6.1 *Priprave*

1.6.1.1 Reagenti

Preskusna voda: pitna voda z vsebnostjo organskega ogljika < 5 mg/liter. Skupna koncentracija ionov kalcija in magnezija ne sme presegati 2,7 mmol/liter, sicer je potrebno ustrezno razredčenje z deionizirano ali destilirano vodo.

Žveplena kislina, analitski reagent (A.R.):	50 g/l
Raztopina natrijevega hidroksida A.R.:	40 g/l
Mineralna hranilna raztopina: raztopiti v enem litru deionizirane vode:	
amonijev klorid, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
natrijev dihidrogenfosfat, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A.R.:	33,4 g
kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
dikalijev monohidrogenfosfat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Zmes služi kot hranilni in pufrski sistem.

1.6.1.2 Naprave

Steklene posode s prostornino od enega do štirih litrov (npr. cilindrične posode).

Mešalec s steklenim ali kovinskim mešalom na primerni ročici (mešalec naj rotira približno 5 do 10 cm nad dnom posode). Namesto tega se lahko uporabi magnetno mešalo s 7 do 10 cm dolgim telesom.

Steklena cev notranjega premera 2 do 4 mm za dotok zraka. Odprtina cevi naj bo približno 1 cm nad dnom posode.

Centrifuga (približno 3 550 g).

Merilec pH vrednosti.

Merilec raztopljenega kisika.

Papirni filtri.

▼B

Naprave za membransko filtracijo.

Filtrirne membrane z velikostjo por 0,45 μm. Filtrirne membrane so primerne, če je zagotovljeno, da ne izpuščajo ogljika in ne absorbirajo snovi med filtriranjem.

Analitska oprema za določanje vsebnosti organskega ogljika in kemijske potrebe po kisiku.

1.6.1.3 Priprava inokuluma

Aktivno blato iz biološke čistilne naprave se spere s (ponavljajočim) centrifugiranjem ali usedanjem v preskusni vodi (zgoraj).

Aktivno blato mora biti v ustreznem stanju. Takšno blato je na voljo v primerno delujoči čistilni napravi odpadnih vod. Da bi dobili čim več različnih vrst ali sevov bakterij, je priporočljivo zmešati inokulume iz različnih virov (npr. različne čistilne naprave, ekstrakti tal, rečnih vod, itd.). Mešanico je treba tretirati, kot je opisano zgoraj.

Za preverjanje aktivnosti aktivnega blata glej točko „Funkcionalni nadzor“ spodaj.

1.6.1.4 Priprava preskusnih raztopin

V preskusno posodo dodajte 500 ml preskusne vode, 2,5 ml/liter mineralne hranilne raztopine in aktivno blato v količini, ki ustreza od 0,2 do 1,0 g/liter suhe snovi v končni mešanici. Dodajte zadostno količino osnovne raztopine preskusne snovi, da bo v končni mešanici koncentracija DOC od 50 do 400 mg/liter. Ustrezne vrednosti KPK so 100 do 1 000 mg/liter. Dopolnite s preskusno vodo do skupne prostornine od enega do štirih litrov. Skupna prostornina, ki jo je treba izbrati, je odvisna od števila vzorcev, ki jih je treba vzeti za določitev DOC ali KPK, ter prostornin, potrebnih za analitski postopek.

Običajno je zadovoljiva prostornina dveh litrov. Sestavi se najmanj ena kontrolna posoda (negativna kontrola), vzporedno z vsako preskusno serijo; ta vsebuje samo aktivno blato in mineralno hranilno raztopino v preskusni vodi enake skupne prostornine kot v preskusnih posodah.

1.6.2 *Izvajanje preskusa*

Preskusne posode se premešajo z magnetnimi mešali ali propelerji pod razpršeno svetlobo ali v temnem prostoru pri 20 do 25 °C. Prezračevanje se doseže s stisnjenim zrakom, po potrebi prečiščenim skozi bombažni filter in, če je potrebno steklenico za pranje. Zagotoviti je treba, da se blato ne usede, in da koncentracija kisika ne pade pod 2 mg/liter.

pH vrednost je treba preverjati v rednih časovnih presledkih (npr. vsak dan) in po potrebi prilagoditi na pH 7 do 8.

▼B

Izgube zaradi izhlapevanja se nadomesti tik pred vsakim vzorčenjem z deionizirano ali destilirano vodo v zahtevanih količinah. Dober postopek je označevanje nivoja tekočine na posodi pred začetkom preskusa. Nove oznake se naredijo po vsakem vzorčenju (brez zračenja in mešanja). Prvi vzorci se vedno vzamejo tri ure po začetku preskusa, da bi se odkrilo adsorpcijo preskusnega materiala v aktivnem blatu.

Odstranitvi preskusnega materiala se sledi z določitvami DOC in KPK, ki se jih opravi vsak dan ali v kakšnem drugem rednem časovnem presledku. Vzorci iz preskusne posode ali negativne kontrole se prefiltrirajo skozi previdno opran papirni filter. Prvih 5 ml filtrata preskusne snovi se zavrže. Blato, ki ga je težko filtrirati, se lahko predhodno odstrani z 10 minutnim centrifugiranjem. Določitve DOC in KPK se opravijo najmanj v dvojniku. Preskus poteka do 28 dni.

Opomba: Vzorci, ki ostanejo motni, se prefiltrirajo skozi membranske filtre. Membranski filtri ne smejo prepuščati ali adsorbirati nikakršnega organskega materiala.

Funkcionalni nadzor aktivnega blata

Posoda, ki vsebuje znano snov, se uporabi vzporedno z vsako preskusno serijo, da se preveri funkcionalno zmogljivost aktivnega blata. V ta namen velja za uporabnega dietilenglikol.

Prilagoditev

Če se analize opravijo v relativno kratkih časovnih presledkih (npr. vsak dan), je prilagoditev mogoče jasno prepoznati na krivulji razgradnje (glej Sliko 2). Preskus naj se zato ne prične tik pred koncem tedna.

Če do prilagoditve pride ob koncu tega obdobja, je preskus mogoče podaljšati do zaključka razgradnje.

Opomba: Če je potrebno širše poznavanje vedenja prilagojenega blata, se isto aktivno blato še enkrat izpostavi istemu preskusnemu materialu v skladu z naslednjim postopkom:

Izklopite mešalo in prezračevalo ter pustite, da se aktivno blato usede. Odlijte tekočino supernatanta, napolnite do dveh litrov s preskusno vodo, mešajte 15 minut in ponovno pustite, da se usede. Ko ponovno odlijete tekočino supernatanta, uporabite preostalo blato za ponovitev preskusa z enakim materialom v skladu z 1.6.1.4 in 1.6.2 zgoraj. Aktivno blato je namesto s usedanjem mogoče izolirati tudi s centrifugiranjem.

Prilagojeno blato se lahko zmeša s svežim do koncentracije 0,2 do 1 g suhe teže/liter.

▼B

Analitska sredstva

Vzorci se običajno filtrirajo skozi previdno opran papirni filter (za pranje uporabite deionizirano vodo).

Vzorci, ki ostanejo motni, se filtrirajo skozi membranske filtre (0,45 μm).

Koncentracija DOC se določi v dvojniku v filtratih vzorcev (prvih 5 ml se zavrže) s pomočjo instrumenta za določanje TOC. Če filtrata ni mogoče analizirati še isti dan, se ga mora do naslednjega dne shraniti v hladilniku. Daljše shranjevanje ni priporočljivo.

Koncentracijo KPK se določi v filtratih vzorcev z analitskim postopkom, opisanim v viru (2) spodaj.

2. **PODATKI IN OCENA**

Koncentracije DOC in/ali KPK se določijo najmanj v dvojniku na vzorcih, v skladu s 1.6.2 zgoraj. Razgradnja v času T se izračuna v skladu s formulo (z opredelitvami pojmov), podano v točki 1.2 zgoraj.

Obseg razgradnje se zaokroži na najbližji celi odstotek. Obseg razgradnje, dosežene na koncu preskusa, se opiše kot „Biorazgradljivost v Zahn-Wellensovem preskusu“.

Opomba: Če je do popolne razgradnje prišlo pred zaključkom preskusa in je ta rezultat potrjen z drugo analizo, opravljeno naslednji dan, se preskus lahko zaključi.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— začetna koncentracija snovi,

— vsi drugi podatki in rezultati preskusa v zvezi s preskusno snovjo, referenčno snovjo, če je uporabljena, in negativno kontrola,

— koncentracija po treh urah,

— krivulja biorazgradnje z opisom,

— datum in mesto vzorčenja preskusnih organizmov, status prilagoditve, uporabljena koncentracija, itd.,

— znanstveni razlogi za vsako spremembo preskusnega postopka.

3.2 RAZLAGA REZULTATOV

Odstranitev DOC (KPK), ki poteka postopoma nekaj dni ali tednov, pomeni, da se preskusna snov biološko razgrajuje.

▼B

Svojo vlogo pa lahko v nekaterih primerih odigra tudi fizikalno-kemijska adsorpcija, to pa se pokaže, kadar gre za celotno ali delno odstranitev na samem začetku, v prvih treh urah, razlika med kontrolo in preskusnimi supernatantnimi raztopinami pa ostaja na nepričakovano nizki ravni.

Za razlikovanje med biološko razgrajenostjo (ali delno biološko razgrajenostjo) in adsorpcijo je treba opraviti dodatne preskuse,

To je mogoče opraviti na številne načine, najprepričljivejša pa je uporaba supernatanta ali blata kot inokuluma v preskusu osnovne zbirke (po možnosti respirometrični preskus).

Preskusne snovi, ki v tem preskusu dajo visoko, neadsorptivno odstranitev DOC (KPK) je treba šteti za potencialno biorazgradljive. Delna, neadsorptivna odstranitev pomeni, da je kemikalija do neke mere podvržena nekakšni biorazgradnji. Nizka ali nična odstranitev DOC (KPK) lahko pomeni, da preskusna snov zavira mikroorganizme, to pa je mogoče ugotoviti tudi z lizo in izgubo blata, kar povzroča motne supernatante. Preskus je treba ponoviti z uporabo nižje koncentracije preskusne snovi.

Uporaba za spojino značilne analitske metode ali preskusne snovi s 14C označeno preskusno snovjo lahko omogoči večjo občutljivost. V primeru 14C preskusne spojine bo obnovitev 14 CO_2 potrdila, da je prišlo do biorazgradnje.

Kadar so rezultati podani za primarno biorazgradnjo, je treba, če je mogoče, razložiti spremembo kemijske strukture, ki povzroča zmanjšanje odziva matične preskusne snovi.

Validacija analitske metode mora biti podana skupaj z opaženim odzivom, v preskusnem mediju negativne kontrole.

4. **VIRI**

(1) OECD, Pariz, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, str. 1).

▼B

Dodatek

PRIMER OCENE

Organska spojina:	4-etoksibenzenska kislina
Teoretična preskusna koncentracija:	600 mg/l
Teoretični DOC:	390 mg/l
Inokulum	čistilna naprava odplak
Koncentracija:	1 gram suhega materiala/liter
Status prilagoditve:	neprilagojen
Analiza:	določitev DOC
Količina vzorca:	3 ml
Kontrolna snov:	dietilenglikol
Strupenost spojine:	ni strupenih učinkov pod 1 000 mg/l uporabljen preskus: preskus s fermentacijskimi cevmi

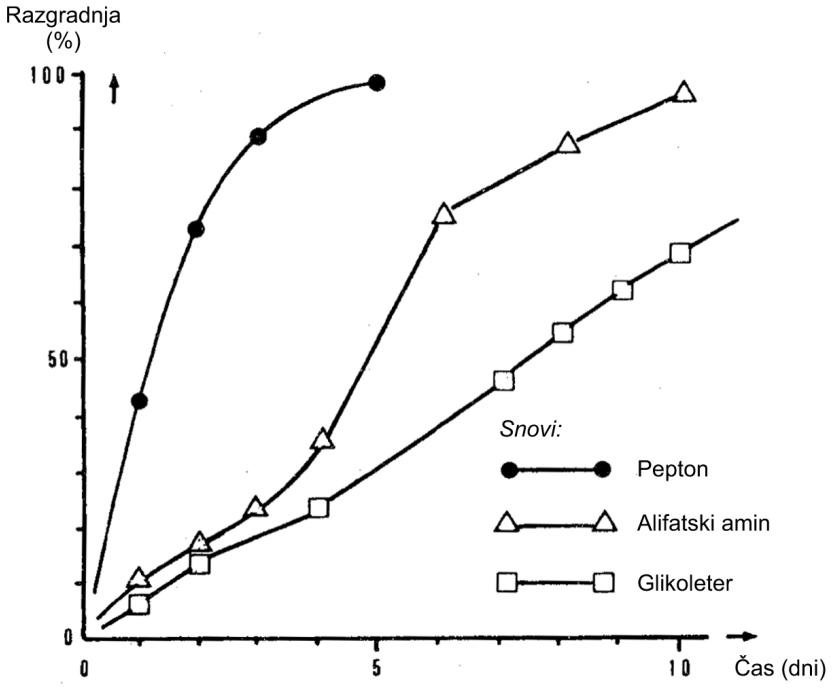
Trajanje preskusa	Kontrolna snov				Preskusna snov		
	negativna kontrola ROO ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	KPK neto mg/l	Razgradnja %	DOC ([1]) mg/l	KPK neto mg/l	Razgradnja %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ure	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dan	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dneva	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dni	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dni	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dni	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dni	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dni	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dni	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Srednje vrednosti treh določitev.

▼B

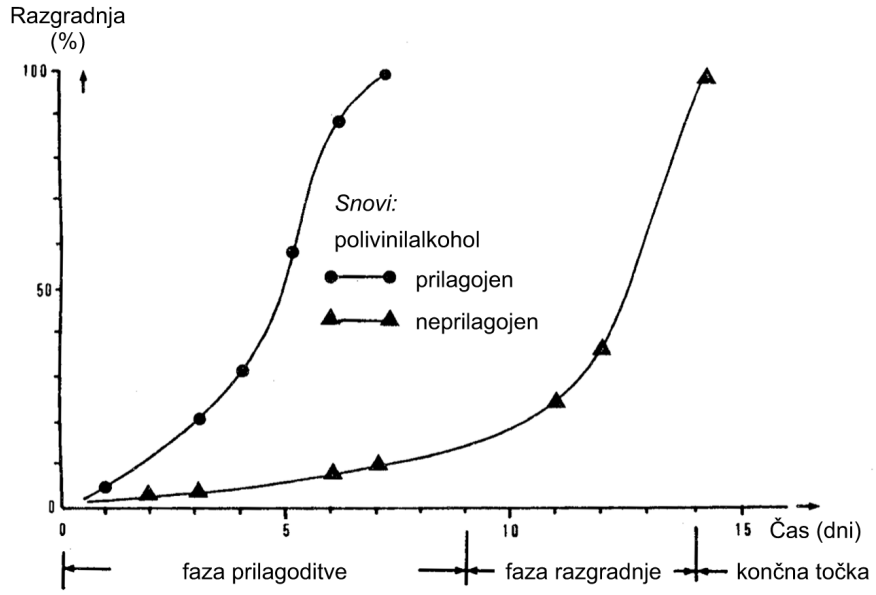
Slika 1

Primeri krivulj biorazgradnje



Slika 2

Primeri prilagoditve blata



▼M4

C.10: **SIMULACIJSKI PRESKUS ZA AEROBNO ČIŠČENJE ODPADNE VODE: C.10-A: ENOTE Z AKTIVNIM BLATOM – C.10-B: BIOFILMI**

C.10-A: **Enote z aktivnim blatom**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 303 (2001). V petdesetih letih prejšnjega stoletja so spoznali, da na novo uvedene površinsko aktivne snovi povzročajo čezmerno penjenje v čistilnih napravah in rekah. Te snovi z aerobnim čiščenjem niso bile v celoti odstranjene, v nekaterih primerih pa so tudi omejevale odstranjevanje drugih organskih snovi. To je sprožilo številne raziskave o tem, kako bi bilo mogoče površinsko aktivne snovi odstraniti iz odpadnih voda in ali se nove kemikalije, ki jih proizvaja industrija, pri čiščenju odpadne vode odstranijo. Za to so bili uporabljeni modeli enot, ki so predstavljali dve glavni vrsti aerobnega biološkega čiščenja odpadne vode (z aktivnim blatom in precejanjem). Zelo nepraktično in drago bi bilo, če bi vsako novo kemikalijo razširili po velikih čistilnih napravah in jo spremljali pri njih, tudi če bi se to izvajalo na lokalni ravni.

ZAČETNI PREUDARKI

Enote z aktivnim blatom

2. V opisih modelov enot z aktivnim blatom je navedena velikost od 300 ml do približno 2 000 ml. Nekateri modeli so bili natančni posnetki naprav v naravni velikosti z usedalniki blata, pri katerih se usedeno blato črpa nazaj v prezračevalni bazen, medtem ko so bili drugi brez usedalnikov, npr. Swisher (1). Velikost naprave je kompromis; biti mora dovolj velika za uspešno mehansko delovanje in zagotovitev zadostne količine vzorcev, ne da bi to vplivalo na delovanje, ne sme pa biti tako velika, da bi bilo potrebnega preveč prostora in materiala.

3. Dve obliki naprav, ki se obsežno in zadovoljivo uporabljata, sta Husmannova naprava (2) in naprava s poroznimi posodami (3) (4), ki sta se najprej uporabljali pri preučevanju površinsko aktivnih snovi in sta opisani v tej preskusni metodi. Zadovoljivo so se uporabljale tudi druge, npr. Eckenfelderjeva naprava (5). Zaradi razmeroma visokih stroškov in velikega truda pri uporabi tega simulacijskega preskusa so se vzporedno raziskovali preprostejši in cenejši presejalni preskusi, ki so zdaj vključeni v poglavje C.4, A–F, te priloge (6). Izkušnje s številnimi površinsko aktivnimi snovmi in drugimi kemikalijami so pokazale, da so se tiste, ki so uspešno opravile presejalne preskuse (dobra biološka razgradljivost), razgradile tudi pri simulacijskem preskusu. Nekatere od tistih, ki presejalnih preskusov niso uspešno opravile, so uspešno opravile preskuse inherentne biološke razgradljivosti (poglavji C.12 (7) in C.19 (8) te priloge), vendar so se samo nekatere iz zadnje skupine razgradile pri simulacijskem preskusu, medtem ko se kemikalije, ki niso uspešno opravile preskusov inherentne biološke razgradljivosti, pri simulacijskih preskusih niso razgradile (9) (10) (11).

4. Za nekatere namene zadostujejo simulacijski preskusi, opravljeni na podlagi enega samega niza obratovalnih pogojev; rezultati so izraženi kot odstotni delež odstranitve preskusne kemikalije ali raztopljenega organskega ogljika (DOC). Tak preskus je opisan v tej preskusni metodi. Vendar v nasprotju s prejšnjo različico tega poglavja, v kateri je bila opisana samo ena vrsta naprave za čiščenje sintetične odpadne vode v sistemu spojenih enot, pri katerem se je uporabljala razmeroma preprosta metoda odvajanja

▼M4

blata, to besedilo ponuja vrsto različnih možnosti. Opisane so različne možnosti glede na vrsto naprave, način delovanja, odpadno vodo in način odvajanja blata. To besedilo natančno sledi besedilu standarda ISO 11733 (12), ki je bil med njegovo pripravo natančno pregledan, čeprav metoda ni bila predmet krožnega testa.

5. Za druge namene mora biti koncentracija preskusne kemikalije v iztoku natančneje znana; za kar pa je potrebna celovitejša metoda. Na primer, hitrost odvajanja blata je treba natančneje kontrolirati ves dan in skozi celoten preskus, naprave pa morajo obratovati pri različnih hitrostih odvajanja blata. Vsestransko celovita metoda zahteva, da se preskusi izvedejo tudi pri dveh ali treh različnih temperaturah: tako metodo je opisal Birch (13) (14) in je povzeta v Dodatku 6. Vendar sedanje znanje ne zadostuje za odločitev, kateri od kinetičnih modelov so uporabni za biološko razgradnjo kemikalij pri čiščenju odpadnih voda in v vodnem okolju na splošno. Uporaba Monodove kinetike, ki je v Dodatku 6 navedena kot primer, je omejena na kemikalije, katerih koncentracija je vsaj 1 mg/l, vendar je po mnenju nekaterih celo to še treba utemeljiti. Preskusi pri koncentracijah, ki so bolj podobne tistim iz odpadnih voda, so navedeni v Dodatku 7, vendar so taki preskusi in preskusi v Dodatku 6 vključeni v dodatke in niso obravnavani kot ločene preskusne metode.

Filtri

6. Mnogo manj pozornosti je bilo namenjene modelom precejalnih filtrov, morda zato, ker so bolj nerodni in manj kompaktni kot modeli čistilnih naprav z aktivnim blatom. Gerike idr. so razvili enote s precejalniki in jih uporabili v sistemu spojenih enot (15). Ti filtri so bili razmeroma veliki (višina 2 m; prostornina 60 l), tako da sta bila za vsakega potrebna kar 2 l/h odpadne vode. Baumann idr. (16) so precejalne filtre simulirali tako, da so trakove iz poliestrske „volne“ najprej za 30 minut namočili v koncentrirano aktivno blato, nato pa jih vstavili v enometrske cevi (z notranjim premerom 14 mm). Preskusna kemikalija je bila kot edini vir ogljika v raztopini mineralnih snovi spuščena po navpični cevi, biološka razgradnja pa je bila ocenjena na podlagi meritev DOC v iztoku in CO_2 v nastalem plinu.

7. Biofiltri so bili simulirani drugače (15); skozi vrteče se cevi, nagnjene pod majhnim kotom glede na vodoravno ploskev, je bila spuščena odpadna voda (približno 250 ml/h) s preskusno kemikalijo in brez nje, v zbranih iztokih pa sta bila analizirana DOC in/ali določena preskusna kemikalija.

NAČELO PRESKUSA

8. Ta metoda je zasnovana za določitev odstranitve ter primarne in/ali končne biološke razgradnje vodotopnih organskih kemikalij z aerobnimi mikroorganizmi v kontinuirano delujočem preskusnem sistemu, ki simulira proces z aktivnim blatom. Lahko biološko razgradljiv organski medij in organska preskusna kemikalija sta vira ogljika in energije za mikroorganizme.

9. Dve kontinuirano delujoči preskusni enoti (napravi z aktivnim blatom ali porozni posodi) obratujeta vzporedno v enakih pogojih, ki so izbrani glede na namen preskusa. Običajno je srednji hidravlični zadrževalni čas 6 h, srednja starost blata (zadrževalni čas blata) pa 6 do 10 dni. Blato se odvaja po eni od dveh metod, preskusna kemikalija pa se običajno doda v koncentraciji 10 mg/l do 20 mg/l raztopljenega organskega ogljika (DOC) v pritok (organskemu mediju) ene od enot. Druga enota se uporablja kot kontrolna enota za določitev biološke razgradnje organskega medija.

▼M4

10. V pogosto vzetih vzorcih iztokov se s specifično analizo določi po možnosti DOC ali kemijska potreba po kisiku (KPK) ter koncentracija preskusne kemikalije (po potrebi) v iztoku iz enote, v katero se dovaja preskusna kemikalija. Domneva se, da razlika med koncentracijama DOC ali KPK v iztoku iz preskusne in kontrolne enote nastane zaradi preskusne kemikalije ali njenih organskih metabolitov. Ta razlika se primerja s koncentracijo DOC ali KPK v pritoku zaradi dodane preskusne kemikalije, da se ugotovi odstranitev preskusne kemikalije.

11. Biološko razgradnjo je običajno mogoče ločiti od biološke adsorpcije s skrbno preučitvijo časovne krivulje odstranitve in jo je običajno mogoče potrditi s preskusom dobre biološke razgradljivosti, pri katerem se uporabi aklimatizirani inokulum iz naprave, v katero se dovaja preskusna kemikalija.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

12. Za pravilno razlago rezultatov morajo biti znani čistost, vodotopnost, hlapnost in adsorpcijske lastnosti preskusne kemikalije. Hlapnih in netopnih kemikalij običajno ni mogoče preskusiti, če se ne sprejmejo posebni previdnostni ukrepi (glej Dodatek 5). Za izračun teoretičnih vrednosti in/ali preverjanje izmerjenih vrednosti parametrov, npr. teoretične potrebe po kisiku (TPK), raztopljenega organskega ogljika (DOC) in kemijske potrebe po kisiku (KPK), je treba poznati kemično strukturo ali vsaj empirično formulo.

13. Informacije o strupenosti preskusne kemikalije za mikroorganizme (glej Dodatek 4) so lahko uporabne za izbiro primernih preskusnih koncentracij in so lahko bistvene za pravilno razlago nizkih vrednosti biološke razgradljivosti.

RAVNI USPEŠNO OPRAVLJENEGA PRESKUSA

14. Pri prvotni uporabi tega simulacijskega (potrditvenega) preskusa za primarno biološko razgradnjo površinsko aktivnih snovi se zahteva več kot 80-odstotna odstranitev določene kemikalije, preden se lahko površinsko aktivna snov da na trg. Če 80-odstotna vrednost ni dosežena, se ta simulacijski (potrditveni) preskus lahko uporabi, površinsko aktivna snov pa se lahko da na trg samo, če je odstranjenih več kot 90 % določene kemikalije. Pri kemikalijah na splošno ni dvoma o uspešno ali neuspešno opravljenem preskusu, dobljena vrednost deleža odstranitve v odstotkih pa se lahko uporabi v približnih izračunih verjetne okoljske koncentracije, ki bo uporabljena pri ocenah nevarnosti, ki jo pomenijo kemikalije. Rezultati navadno sledijo vzorcu vse ali nič. V vrsti raziskav čistih kemikalij je bilo ugotovljeno, da je bil delež odstranitve DOC > 90-odstotni pri več kot treh četrtinah in > 80-odstotni pri več kot 90 % kemikalij, ki so pokazale kakršno koli značilno stopnjo biološke razgradljivosti.

15. V odpadnih vodah je razmeroma malo kemikalij (npr. površinsko aktivnih snovi) prisotnih v koncentracijah (približno 10 mg C/l), uporabljenih pri tem preskusu. Nekatere kemikalije so lahko pri teh koncentracijah zaviralne, medtem ko je lahko kinetika odstranjevanja drugih pri nizkih koncentracijah drugačna. Natančnejša ocena razgradnje bi bila mogoča s spremenjenimi metodami, pri katerih bi se uporabile realno nizke koncentracije preskusne kemikalije, zbrani podatki pa bi se lahko uporabili za izračun kinetičnih konstant. Vendar potrebne poskusne tehnike še niso bile v celoti potrjene niti niso bili vzpostavljeni kinetični modeli, ki opisujejo biološko razgradne reakcije (glej Dodatek 7).

▼M4

REFERENČNE KEMIKALIJE

16. Za zagotovitev pravilnega izvajanja poskusnega postopka je koristno, da se hkrati s preučevanjem preskusnih kemikalij občasno preskusijo kemikalije, katerih obnašanje je znano. Med takimi kemikalijami so adipinska kislina, 2-fenilfenol, 1-naftol, difenil-2,2-dikarboksilna kislina in 1-karboksi naftalenska kislina (9) (10) (11).

OBNOVLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

17. O raziskavah simulacijskih preskusov je veliko manj poročil kot o preskusih lahke biološke razgradljivosti. Ponovljivost pri (sočasnih) ponovitvah je dobra (med 10- in 15-odstotna) pri preskusnih kemikalijah, katerih razgradnja je 80- ali več odstotna, vendar pa je pri kemikalijah, pri katerih razgradnja ni tako dobra, variabilnost večja. Prav tako so bili pri nekaterih mejnih kemikalijah dobljeni zelo različni rezultati (npr. 10 %, 90 %) ob različnih časih v obdobju devetih tednov, ki je dopuščeno za preskus.

18. Pri rezultatih, pridobljenih z dvema vrstama naprave, so bile razlike majhne, vendar pa so se nekatere kemikalije bolj in dosledneje razgrajevale pri gospodinjski odpadni vodi kot pri sintetični odpadni vodi OECD.

OPIS PRESKUSNE METODE

Naprava

Preskusni sistem

19. Preskusni sistem za eno preskusno kemikalijo sestavljata preskusna in kontrolna enota; če se izvajajo samo specifične analize (primarna biološka razgradnja), je potrebna samo preskusna enota. Ena kontrolna enota se lahko uporablja za več preskusnih enot, ki prejemajo enake ali različne preskusne kemikalije. V primeru sistema spojenih enot (Dodatek 3) mora imeti vsaka preskusna enota svojo kontrolno enoto. Preskusni sistem je lahko model čistilne naprave z aktivnim blatom, Husmannova naprava (Dodatek 1, slika 1) ali porozna posoda (Dodatek 1, slika 2). V obeh primerih so potrebne dovolj velike posode za shranjevanje pritokov in iztokov ter črpalke za odmerjanje pritoka, bodisi zmešanega z raztopino preskusne kemikalije bodisi ločenega.

20. Vsako čistilno napravo z aktivnim blatom sestavljata prezračevalna posoda z znano prostornino približno 3 litrov aktivnega blata in usedalnik (sekundarni bistrilnik) s prostornino približno 1,5 litra; prostornini se lahko deloma spremenita z nastavitvijo višine usedalnika. Dopustne so posode drugačnih velikosti, če delujejo s primerljivimi hidravličnimi obremenitvami. Če temperature v preskusnem prostoru ni mogoče ohranjati v želenem razponu, se priporoča uporaba posod z vodnim plaščem z nadzorovano temperaturo. Za recikliranje aktivnega blata iz usedalnika v prezračevalno posodo, bodisi kontinuirano bodisi v rednih presledkih, se uporablja črpalka „airlift“ ali dozirna črpalka.

21. Sistem poroznih posod je sestavljen iz notranjega poroznega valja s stožčastim dnom, ki stoji v nekoliko večji posodi enake oblike, narejeni iz neprepustnega plastičnega materiala. Primeren material za porozno posodo je porozni polietilen z največjo velikostjo por 90 μm in debelino 2 mm. Blato se iz obdelanega organskega medija se ločuje z diferencialnim prehodom skozi porozno steno. Iztoki se zbirajo v krožnem prostoru, od koder se prelivajo v zbiralnik. Usedanja ni, zato se blato ne vrača. Celotni sistem se lahko namesti v vodno kopel, nadzorovano s termostatom. Porozne posode se zamašijo, zato lahko v začetnih fazah pride do razlivanja. V takem primeru je treba

▼M4

porozni vložek zamenjati s čistim, pri čemer se blato najprej izčrpa iz posode v čisto vedro, nato pa se odstrani zamašeni vložek. Ko je neprepustni zunanji valj očiščen, se vstavi čist vložek, blato pa se vrne v posodo. Prav tako je treba skrbno postrgati in prenesti blato, ki se je prijelo ob straneh zamašenega vložka. Zamašene posode se najprej očistijo s tankim curkom vode, da se odstrani preostalo blato, zatem se namočijo v razredčeno raztopino natrijevega hipoklorita in nato v vodo, nazadnje pa se temeljito sperejo z vodo.

22. Za prezračevanje blata v prezračevalnih posodah obeh sistemov so potrebne primerne tehnike, na primer sintrane kocke (difuzorji) in stisnjen zrak. Zrak se po potrebi očisti tako, da prehaja skozi primeren filter in nato opere. Skozi sistem mora prehajati zadostna količina zraka, da se vzdržujejo aerobni pogoji in da se kosmi blata ves čas preskusa ohranjajo v suspenziji.

Naprava za filtriranje ali centrifuga

23. Naprava za filtriranje vzorcev z membranskimi filtri ustrezne poroznosti (nazivni premer odprtine 0,45 μm), ki adsorbirajo topne organske kemikalije in sprostijo čim manj organskega ogljika. Če se uporabljajo filtri, ki sproščajo organski ogljik, jih je treba skrbno sprati z vročo vodo, da se odstrani izlužljivi organski ogljik. Namesto tega se lahko uporabi centrifuga, ki lahko doseže 40 000 m/s^2.

Analitska oprema

24. Naprava, potrebna za določitev:

— DOC (raztopljenega organskega ogljika) in TOC (celotnega organskega ogljika) ali KPK (kemijske potrebe po kisiku),

— določene kemikalije, če se to zahteva,

— suspendiranih trdnih snovi, vrednosti pH, koncentracije kisika v vodi,

— temperature, kislosti in bazičnosti,

— amonija, nitrita in nitrata, če se preskus izvaja v nitrifikacijskih pogojih.

Voda

25. Vodovodna voda, ki vsebuje manj kot 3 mg/l DOC. Če bazičnost še ni znana, jo je treba določiti.

26. Deionizirana voda, ki vsebuje manj kot 2 mg/l DOC.

Organski medij

27. Kot organski medij so dovoljene sintetične odpadne vode, gospodinjske odpadne vode ali oboje. Izkazalo se je (11) (14), da je pri uporabi samo gospodinjske odpadne vode delež odstranitve DOC pogosto večji ter da celo omogoča odstranitev in biološko razgradnjo nekaterih kemikalij, ki se biološko ne razgradijo, kadar se uporabi sintetična odpadna voda OECD. Prav tako stalno ali občasno dodajanje gospodinjske odpadne vode pogosto stabilizira aktivno blato, vključno z bistveno zmožnostjo dobrega usedanja. Zato se priporoča uporaba gospodinjske odpadne vode. Koncentracijo DOC ali KPK je treba izmeriti v vsaki novi šarži organskega medija. Poznati je treba njegovo kislost ali bazičnost. Pri nizki kislosti ali bazičnosti mu je morda treba dodati primeren pufer (natrijev hidrogen karbonat ali kalijev dihidrogen fosfat), da se med preskusom vrednost pH v prezračevalni posodi ohranja pri približno 7,5 ± 0,5. O količini puferja, ki jo je treba dodati, in času, ko ga je treba dodati, je treba odločiti v vsakem primeru posebej. Kadar se bodisi redno bodisi občasno uporabljajo zmesi, je treba ohranjati približno konstantno vrednost DOC (ali KPK) v zmesi, npr. z redčenjem z vodo.

▼M4

Sintetična odpadna voda

28. V vsakem litru vodovodne vode je treba raztopiti: 160 mg peptona; 110 mg mesnega ekstrakta; 30 mg sečnine; 28 mg brezvodnega dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4); 7 mg natrijevega klorida (NaCl); 4 mg kalcijevega klorid dihidrata ($CaCl_2.2H_2O$) in 2 mg magnezijevega sulfat heptahidrata ($Mg_2SO_4.7H_20$). Ta sintetična odpadna voda OECD je primer in predstavlja srednjo koncentracijo DOC v pritoku, ki znaša približno 100 mg/l. Uporabijo se lahko tudi druge sestave s približno enako koncentracijo DOC, ki so bolj podobne pravi odpadni vodi. Če je potreben manj koncentriran pritok, je treba sintetično odpadno vodo razredčiti z vodovodno vodo, na primer v razmerju 1 : 1, da nastane koncentracija približno 50 mg/l. Tak šibkejši pritok bo omogočal boljšo rast nitirifikacijskih organizmov, zato je treba to spremembo uporabiti pri simulacijskem preskušanju čistilnih naprav z nitrifikacijo. Ta sintetična odpadna voda se lahko pripravi v destilirani vodi v koncentrirani obliki in shranjuje največ en teden pri približno 1 °C. Po potrebi se razredči z vodovodno vodo. (Ta medij je nezadovoljiv, npr. koncentracija dušika je zelo visoka, vsebnost ogljika je razmeroma nizka, vendar ni bilo predlaganega nič boljšega, razen naj se doda več fosfata kot puferja in dodatni pepton.)

Gospodinjska odpadna voda

29. Uporabiti je treba svežo usedeno odpadno vodo, ki se dnevno zbira iz čistilne naprave, v katero se dovaja pretežno gospodinjska odpadna voda. Pred primarnim usedanjem jo je treba odvzeti iz prelivnega kanala primarnega usedalnika ali vtoka v čistilno napravo z aktivnim blatom, biti pa mora večinoma brez grobih delcev. Odpadna voda se lahko uporabi po večdnevnem shranjevanju (ki na splošno ne sme trajati več kot 7 dni) pri približno 4 °C, če je dokazano, da se DOC (ali KPK) med shranjevanjem ni bistveno zmanjšal (tj. za manj kot 20 %). Da se omejijo motnje v sistemu, je treba DOC (ali KPK) vsake nove šarže pred uporabo uravnati na ustrezno konstantno vrednost, npr. z redčenjem z vodovodno vodo.

Aktivno blato

30. Aktivno blato za inokulacijo je treba zbrati iz prezračevalnega bazena dobro delujoče čistilne naprave ali laboratorijske enote z aktivnim blatom, v kateri se čistijo predvsem gospodinjske odpadne vode.

Založne raztopine preskusne kemikalije

31. Za kemikalije z ustrezno topnostjo je treba pripraviti osnovne raztopine z ustreznimi koncentracijami (npr. 1 do 5 g/l) v deionizirani vodi ali mineralnem deležu sintetične odpadne vode (za netopne in hlapne kemikalije glej Dodatek 5). Določiti je treba DOC in celotni organski ogljik (TOC) osnovne raztopine, meritve pa ponoviti za vsako novo šaržo. Če je razlika med DOC in TOC večja od 20 %, je treba preveriti vodotopnost preskusne kemikalije. DOC ali koncentracijo preskusne kemikalije, izmerjeno s specifično analizo osnovne raztopine, je treba primerjati z nazivno vrednostjo, da se ugotovi, ali je izkoristek dovolj dober (običajno je mogoče pričakovati > 90-odstotni izkoristek). Zlasti za disperzije je treba ugotoviti, ali je mogoče DOC uporabiti kot analitski parameter ali ne oziroma ali je mogoče uporabiti samo analitsko tehniko, specifično za preskusno kemikalijo. Za disperzije je potrebno centrifugiranje vzorcev. Pri vsaki novi šarži je treba s specifično analizo izmeriti DOC, KPK ali preskusno kemikalijo.

▼M4

32. Določiti je treba pH osnovne raztopine. Skrajne vrednosti kažejo, da lahko dodatek kemikalije vpliva na pH aktivnega blata v preskusnem sistemu. V takem primeru je treba osnovno raztopino nevtralizirati z majhnimi količinami anorganske kisline ali baze, da se doseže vrednost pH 7 ± 0,5, vendar pa je treba preprečiti obarjanje preskusne kemikalije.

POSTOPEK

33. Opisan je postopek za naprave z aktivnim blatom; za sistem s poroznimi posodami ga je treba nekoliko prilagoditi.

Priprava inokuluma

34. Na začetku preskusa je treba preskusni sistem inokulirati bodisi z aktivnim blatom bodisi z inokulumom, ki vsebuje nizko koncentracijo mikroorganizmov. Inokulum je treba do začetka uporabe prezračevati pri sobni temperaturi in ga uporabiti v 24 urah. V prvem primeru se vzorec aktivnega blata vzame iz prezračevalnega bazena učinkovito delujoče biološke čistilne naprave ali laboratorijske čistilne naprave, v katero se dovaja pretežno gospodinjska odpadna voda. Če je treba simulirati nitrifikacijske pogoje, se blato vzame iz čistilne naprave, v kateri poteka nitrifikacija. Določiti je treba koncentracijo suspendiranih trdnih snovi in po potrebi blato zgostiti z usedanjem, tako da je količina, ki se doda v preskusni sistem, minimalna. Zagotoviti je treba, da je začetna koncentracija suhe snovi približno 2,5 g/l.

35. V drugem primeru se kot inokulum uporabi 2 ml/l do 10 ml/l iztoka iz biološke čistilne naprave za gospodinjske odpadne vode. Da bi dobili čim več različnih vrst bakterij, je lahko koristno, če se dodajo inokulumi iz različnih drugih virov, na primer iz površinske vode. V tem primeru se bo aktivno blato razvijalo in raslo v preskusnem sistemu.

Odmerjanje organskega medija

36. Zagotoviti je treba, da so posode za pritok in iztok ter cevi, ki vodijo iz posod za pritok in v posode za iztok, povsem čiste, da se prepreči rast mikrobov na začetku in med celotnim preskusom. Preskusne sisteme je treba sestaviti v prostoru z nadzorovano temperaturo (običajno 20 do 25 °C) ali pa je treba uporabiti preskusne enote z vodnim plaščem. Pripraviti je treba zadostno količino potrebnega organskega medija (odstavki 27 do 29). Najprej se z organskim medijem napolnita prezračevalna posoda in usedalnik, nato se doda inokulum (odstavka 34 in 35). Začne se prezračevanje, tako da se blato ohranja v suspenziji in v aerobnem stanju; nato se začne odmerjanje pritoka in recikliranje usedenega blata. Organski medij se odmerja iz posod za shranjevanje v prezračevalne posode (odstavka 20 in 21) preskusne in kontrolne enote, ustrezni iztoki pa se zbirajo v podobne posode za shranjevanje. Da bi dobili običajni hidravlični zadrževalni čas 6 h, se organski medij črpa s pretokom 0,5 l/h. Za potrditev tega pretoka je treba izmeriti dnevno količino odmerjenega organskega medija, tako da se zapiše zmanjšanje prostornine medija v posodah za shranjevanje. Za določitev učinkov občasnega spuščanja ali „udarne“ obremenitve s kemikalijami bi bili potrebni drugi načini odmerjanja.

37. Če je organski medij pripravljen za uporabo več kot 1 dan, je potrebno hlajenje pri približno 4 °C ali druge ustrezne metode ohranjanja, da se preprečita rast mikrobov in biološka razgradnja zunaj preskusnih enot (odstavek 29). Če se uporablja sintetična odpadna voda, je mogoče pripraviti koncentrirano osnovno raztopino (npr. 10-kratnik običajne koncentracije, odstavek 28) in jo shranjevati pri približno 4 °C. Ta osnovna raztopina se lahko pred uporabo dobro zmeša z ustrezno količino vodovodne vode, lahko pa se tudi črpa neposredno, medtem ko se ustrezna količina vodovodne vode črpa ločeno.

▼M4

Odmerjanje preskusne kemikalije

38. Ustrezna količina osnovne raztopine preskusne kemikalije (odstavek 31) se doda v posodo za shranjevanje pritoka ali pa se s posebno črpalko odmeri neposredno v prezračevalno posodo. Običajna srednja preskusna koncentracija v pritoku mora biti med 10 mg/l in 20 mg/l DOC, zgornja koncentracija pa ne sme presegati 50 mg/l. Če je preskusna kemikalija slabo topna v vodi ali če obstaja velika možnost za nastanek strupenih učinkov, je treba koncentracijo zmanjšati na 5 mg/l DOC ali celo manj, vendar samo če je na voljo in izvedena primerna specifična analitska metoda (s posebnimi tehnikami odmerjanja se lahko dodajo dispergirane preskusne kemikalije, ki so slabo topne v vodi, glej Dodatek 5).

39. Potem ko se sistem stabilizira in učinkovito odstranjuje DOC organskega medija (približno 80 %), se začne dodajati preskusna kemikalija. Pred tem je treba preveriti, ali vse enote delujejo enako učinkovito; če ne, običajno pomaga, če se posamezna blata zmešajo in se v posamezne enote znova razdelijo enake količine. Kadar se uporabi inokulum iz (približno) 2,5 g/l (suhe teže) aktivnega blata, se lahko preskusna kemikalija dodaja od začetka preskusa, saj neposredno dodajanje vedno večjih količin od začetka omogoča, da se lahko aktivno blato bolje prilagodi preskusni kemikaliji. Ne glede na način dodajanja preskusne kemikalije je priporočljivo, da se v rednih presledkih merijo ustrezni pretok in/ali prostornine v posodah za shranjevanje.

Ravnanje z aktivnim blatom

40. Koncentracija trdnih snovi v aktivnem blatu se med preskusom običajno stabilizira znotraj omejitev ne glede na uporabljeni inokulum, in sicer znaša 1 do 3 g/l (suhe teže), odvisno od kakovosti in koncentracije organskega medija, obratovalnih pogojev, narave prisotnih mikroorganizmov in vpliva preskusne kemikalije.

41. Treba je bodisi vsaj tedensko določiti suspendirane trdne snovi v prezračevalnih posodah in odstraniti odvečno blato, da se ohrani koncentracija 1 do 3 g/l (suhe teže), bodisi vzdrževati srednjo starost blata pri konstantni vrednosti, običajno v razponu 6 do 10 dni. Če je na primer izbran zadrževalni čas blata 8 dni, je treba vsak dan odstraniti 1/8 aktivnega blata v prezračevalni posodi in ga zavreči. To je treba izvajati vsak dan, po možnosti s samodejno črpalko, ki deluje v presledkih. Z vzdrževanjem konstantne koncentracije suspendiranih trdnih snovi ali vzdrževanjem te koncentracije v ozkih mejah se ne vzdržuje konstantni zadrževalni čas blata (SRT), ki je obratovalna spremenljivka, ki določa vrednost koncentracije preskusne kemikalije v iztoku.

42. Med celotnim preskusom je treba vsaj enkrat na dan odstraniti vse blato, ki se prime na stene prezračevalne posode in usedalnika, tako da se znova suspendira. Redno je treba preverjati in čistiti vse cevi, da se prepreči rast biofilma. Usedeno blato iz usedalnika je treba reciklirati v prezračevalno posodo, po možnosti s črpanjem v presledkih. V sistemu poroznih posod recikliranja ni, vendar je treba zagotoviti, da se vstavijo čiste notranje posode, preden se prostornina v posodi znatno poveča (odstavek 21).

43. V Husmannovih enotah lahko pride do slabega usedanja in izgube blata. To je mogoče popraviti z enim ali več spodaj navedenimi ukrepi, ki se izvedejo sočasno v preskusni in kontrolni enoti:

— v rednih presledkih, npr. tedensko, se lahko dodaja sveže blato ali flokulant (na primer 2 ml/posodo 50 g/l $FeCl_3$), vendar se je treba prepričati, da ne pride do reakcije ali obarjanja preskusne kemikalije s $FeCl_3$,

▼M4

— črpalka „airlift“ se lahko nadomesti s peristaltično črpalko, s čimer se omogočita pretok reciklata, ki je približno enak pretoku pritoka, ki ga je treba uporabiti, in razvoj anaerobnega območja v usedenem blatu (geometrija črpalke „airlift“ omejuje minimalni pretok povratnega blata na približno 12-kratnik pretoka pritoka),

— blato se lahko v presledkih črpa iz usedalnika v prezračevalno posodo (npr. 5 minut vsake 2,5 h, da se reciklira od 1 l/h do 1,5 l/h),

— za preprečitev izgube zaradi penjenja se lahko uporabi nestrupeno sredstvo proti penjenju v minimalni koncentraciji (npr. silikonsko olje),

— skozi blato v usedalniku se lahko v kratkih udarnih curkih spušča zrak (npr. 10 sekund vsako uro),

— organski medij se lahko v prezračevalno posodo odmerja v presledkih (npr. od 3 do 10 minut vsako uro).

Vzorčenje in analiza

44. V rednih presledkih je treba meriti koncentracijo raztopljenega kisika, temperaturo in vrednost pH aktivnega blata v prezračevalnih posodah. Zagotoviti je treba, da je vedno na voljo dovolj kisika (> 2 mg/l) in da se temperatura vzdržuje v zahtevanem obsegu (običajno 20 do 25 °C). Vrednost pH je treba vzdrževati pri 7,5 ± 0,5 z odmerjanjem majhnih količin anorganske baze ali kisline v prezračevalno posodo ali pritok ali s povečevanjem puferske sposobnosti organskega medija (glej odstavek 27). Pri nitrifikaciji nastane kislina, pri čemer pri oksidaciji 1 mg N nastane ekvivalent približno 7 mg CO_3^-. Pogostost meritev je odvisna od parametra, ki ga je treba izmeriti, in stabilnosti sistema, lahko pa se izvajajo dnevno ali tedensko.

45. Izmeriti je treba DOC ali KPK v pritokih v kontrolne in preskusne posode. S specifično analizo je treba izmeriti koncentracijo preskusne kemikalije v preskusnem pritoku ali jo oceniti na podlagi koncentracije v osnovni raztopini (odstavek 31), uporabljene količine in količine odpadne vode, odmerjene v preskusno enoto. Priporočljivo je, da se koncentracija preskusne kemikalije izračuna, da se zmanjša variabilnost podatkov o koncentraciji.

46. Iz zbranega iztoka je treba vzeti primerne vzorce (npr. 24-urne sestavljene vzorce) in jih filtrirati skozi membrano z velikostjo por 0,45 μm ali jih približno 15 minut centrifugirati pri približno 40 000 m/s^2. Centrifugiranje je treba uporabiti, če je filtriranje težavno. DOC ali KPK je treba določiti vsaj v dveh ponovitvah, da se s specifično analizo za preskusno kemikalijo izmeri končna biološka razgradnja in po potrebi primarna biološka razgradnja.

47. Uporaba KPK lahko pri nizkih koncentracijah povzroči analitične težave, zato se priporoča samo, če je uporabljena dovolj visoka preskusna koncentracija (približno 30 mg/l). Prav tako se za kemikalije, ki se močno adsorbirajo, priporoča, da se količina adsorbirane kemikalije v blatu izmeri z analitsko tehniko, specifično za preskusno kemikalijo.

48. Pogostost vzorčenja je odvisna od pričakovanega trajanja preskusa. Priporoča se vzorčenje trikrat na teden. Ko enote učinkovito delujejo, je treba omogočiti prilagajanje, ki traja od 1 do največ 6 tednov po vnosu preskusne kemikalije, da se doseže stabilno stanje. Po možnosti je treba za oceno rezultata preskusa pridobiti najmanj 15 veljavnih vrednosti v fazi konstantne ravni (odstavek 59), ki običajno traja 3 tedne. Preskus se lahko konča, če je dosežena zadostna stopnja odstranitve (npr. > 90-odstotna) in je na voljo teh 15 vrednosti, ki predstavljajo analize, ki so se 3 tedne izvajale vsak delovni dan. Običajno preskus ne sme trajati več kot 12 tednov po tem, ko je bila dodana preskusna kemikalija.

▼M4

49. Če se v blatu začne nitrifikacija in je treba preučiti učinke preskusne kemikalije na nitrifikacijo, je treba vzorce iz iztoka preskusne in kontrolne enote vsaj enkrat tedensko analizirati za določitev amonija in/ali nitrita in nitrata.

50. Vse analize je treba izvesti čim prej, zlasti določitve dušika. Če je treba analize odložiti, je treba vzorce shraniti v temnem prostoru v polnih in tesno zaprtih steklenicah pri približno 4 °C. Če je treba vzorce shraniti za več kot 48 h, jih je treba globoko zamrzniti, acidificirati (npr. 10 ml/l raztopine 400 g/l žveplove kisline) ali dodati primerno strupeno snov (npr. 20 ml/l raztopine 10 g/l živosrebrovega (II) klorida). Zagotoviti je treba, da tehnika shranjevanja ne vpliva na rezultate analize.

Spajanje preskusnih enot

51. Če bodo uporabljene spojene enote (Dodatek 3), je treba dnevno izmenjati enako količino aktivnega blata (150 ml do 1 500 ml za prezračevalne posode, ki vsebujejo 3 litre suspenzije) med prezračevalnimi posodami preskusne enote in njene kontrolne enote. Če se preskusna kemikalija močno adsorbira na blato, je treba zamenjati samo supernatant iz usedalnikov. V obeh primerih je treba za izračun rezultatov preskusa uporabiti korekcijski faktor (odstavek 55).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

52. Za vsako časovno določeno oceno se izračuna delež odstranitve DOC ali KPK preskusne kemikalije, za kar se uporabi enačba:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

pri čemer je:

D_t = odstotni delež odstranitve DOC ali KPK v času t,

C_s = DOC ali KPK v pritoku zaradi preskusne kemikalije, po možnosti ocenjen na podlagi osnovne raztopine (mg/l),

E = izmerjena vrednost DOC ali KPK v preskusnem iztoku v času t (mg/l),

E_o = izmerjena vrednost DOC ali KPK v kontrolnem iztoku v času t (mg/l).

53. Stopnja odstranitve DOC ali KPK organskega medija v kontrolni enoti je koristna informacija pri oceni biorazgradne dejavnosti aktivnega blata med preskusom. Delež odstranitve se izračuna z enačbo:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

pri čemer je:

D_B = odstotni delež odstranitve DOC ali KPK organskega medija v kontrolni enoti v času t,

C_M = DOC ali KPK organskega medija v kontrolnem pritoku (mg/l).

▼M4

Po želji se lahko izračuna tudi delež odstranitve DOC ali KPK zaradi organskega medija in preskusne kemikalije v preskusni enoti, za kar se uporabi enačba:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

pri čemer je:

D_T = odstotni delež odstranitve DOC ali KPK celotnega preskusnega pritoka,

C_T = DOC ali KPK celotnega preskusnega pritoka ali izračunan na podlagi osnovnih raztopin (mg/l).

54. Pri vsaki časovno določeni oceni se izračuna odstranitev preskusne kemikalije, če je bila izmerjena s specifično analitsko metodo, za kar se uporabi enačba:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

pri čemer je:

D_{ST} = odstotni delež primarne odstranitve preskusne kemikalije v času t,

S_i = izmerjena ali ocenjena koncentracija preskusne kemikalije v preskusnem pritoku (mg/l),

S_e = izmerjena koncentracija preskusne kemikalije v preskusnem iztoku v času t (mg/l).

55. Če je bil uporabljen sistem spojenih enot, je treba razredčenje preskusne kemikalije v prezračevalni posodi zaradi izmenjave blata izravnati s korekcijskim faktorjem (glej Dodatek 3). Če sta bila uporabljena srednji hidravlični zadrževalni čas 6 h in izmenjava polovice količine aktivnega blata v prezračevalni posodi, je treba določene vrednosti dnevne odstranitve (D_t, odstavek 52) popraviti, da se izračuna dejanska stopnja odstranitve, D_{tc}, preskusne kemikalije, za kar se uporabi enačba:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Izražanje rezultatov preskusa

56. Delež odstranitve D_t (ali D_{tc}) in D_{st}, če je na voljo, se prikaže grafično v odvisnosti od časa (glej Dodatek 2). Na podlagi oblike krivulje odstranitve preskusne kemikalije (*per se* ali kot DOC) se lahko izpeljejo nekatere ugotovitve o procesu odstranjevanja.

Adsorpcija

57. Če se velika odstranitev DOC pri preskusni kemikaliji opazi na začetku preskusa, se preskusna kemikalija verjetno odstranjuje z adsorpcijo na trdne snovi aktivnega blata. To je mogoče dokazati z določitvijo adsorbirane preskusne kemikalije s specifično analizo. Odstranitev DOC pri kemikalijah, ki se adsorbirajo, redko ostane visoka med celotnim preskusom; po navadi je stopnja odstranitve visoka na začetku, nato postopoma pade na ravnotežno vrednost. Če pa bi lahko preskusna kemikalija, ki se adsorbira, tako ali drugače povzročila aklimatizacijo mikrobne populacije, bi se odstranitev DOC pri preskusni kemikaliji povečala in dosegla visoko vrednost konstantne ravni.

▼M4

Faza prilagajanja

58. Kot pri statičnih presejalnih preskusih je pri številnih preskusnih kemikalijah pred popolno biološko razgradnjo potrebna faza prilagajanja. V njej se bakterije, ki razgrajujejo, aklimatizirajo ali prilagodijo skoraj brez odstranjevanja preskusne kemikalije; nato nastopi začetna rast teh bakterij. Ta faza se konča, za fazo razgradnje pa se šteje, da se je začela, ko je odstranjenih približno 10 % začetne količine preskusne kemikalije (po dopuščeni adsorpciji, če se zgodi). Faza prilagajanja je pogosto zelo spremenljiva in težko ponovljiva.

Faza konstantne ravni

59. Faza konstantne ravni krivulje odstranjevanja v kontinuiranem preskusu je opredeljena kot faza, v kateri je razgradnja največja. Trajati mora vsaj 3 tedne in imeti približno 15 izmerjenih veljavnih vrednosti.

Srednja stopnja odstranitve preskusne kemikalije

60. Izračuna se srednja vrednost na podlagi vrednosti odstranitve (D_t) preskusne kemikalije v fazi konstantne ravni. Ta stopnja, ki je zaokrožena na najbližje celo število (1 %), je stopnja odstranitve preskusne kemikalije. Priporoča se tudi, da se izračuna 95-odstotni interval zaupanja za srednjo vrednost.

Odstranitev organskega medija

61. Delež odstranitve DOC ali KPK organskega medija v kontrolni enoti (D_B) se prikaže grafično v odvisnosti od časa. Srednja stopnja odstranitve se navede enako kot pri preskusni kemikaliji (odstavek 60).

Znak biološke razgradnje

62. Če se preskusna kemikalija ne adsorbira znatno na aktivno blato in ima krivulja odstranitve značilno obliko krivulje biološke razgradnje s fazo prilagajanja, fazo razgradnje in fazo konstantne ravni (odstavka 58 in 59), je mogoče izmerjeno odstranitev zanesljivo pripisati biološki razgradnji. Če se veliko preskusne kemikalije odstrani že na začetku, simulacijski preskus ne more razlikovati med biološkim in abiotskim procesom odstranitve. V takih in drugih primerih, v katerih obstaja dvom o biološki razgradnji (npr. pri ločevanju (stripping)), je treba analizirati adsorbirane preskusne kemikalije ali opraviti dodatne statične preskuse biološke razgradnje na podlagi parametrov, ki jasno nakazujejo biološke procese. Taki preskusi so metode porabe kisika (poglavje C.4-D, E in F te priloge (6)), ali preskus z merjenjem nastajanja ogljikovega dioksida (poglavje C.4-C te priloge (6)), ali metoda nadprostora ISO (18), pri kateri se uporabi predhodno izpostavljeni inokulum iz simulacijskega preskusa. Če sta bili izmerjeni odstranitev DOC in odstranitev specifične kemikalije, velike razlike med odstranjenimi deleži (pri čemer je prva vrednost nižja od druge) kažejo, da so bili v iztokih vmesni organski produkti, ki se morda težje razgradijo kot matična kemikalija.

Veljavnost rezultatov preskusa

63. Informacije o običajnem biorazgradnem obnašanju inokuluma se pridobijo, če je določena stopnja odstranitve organskega medija (odstavek 53) v kontrolni enoti. Preskus je treba šteti za veljaven, če je stopnja odstranitve DOC ali KPK v kontrolnih enotah po dveh tednih > 80-odstotna in če ni bilo opaženega nič nenavadnega.

▼M4

64. Če je bila uporabljena lahko biološko razgradljiva (referenčna) kemikalija, mora biti stopnja biološke razgradnje (D_t, odstavek 52) > 90-odstotna.

65. Če preskus poteka v nitrifikacijskih pogojih, mora biti srednja koncentracija v iztokih < 1 mg/l amonijevega dušika in < 2 mg/l nitritnega dušika.

66. Če ta merila (odstavki 63 do 65) niso izpolnjena, je treba preskus ponoviti z inokulumom iz drugega vira, preskusiti referenčno kemikalijo in pregledati vse poskusne postopke.

Poročilo o preskusu

67. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— identifikacijski podatki,

— fizikalno stanje, in kjer je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti.

Preskusni pogoji:

— vrsta preskusnega sistema; spremembe za preskuse netopnih in hlapnih kemikalij,

— vrsta organskega medija,

— delež in vrsta industrijskih odplak v odpadni vodi, če sta znana,

— inokulum, vrsta in mesta vzorčenja, koncentracija in predobdelava,

— založna raztopina preskusne kemikalije: vsebnost DOC in TOC; kako je pripravljena, če je suspenzija; uporabljena preskusna koncentracija; razlogi za odstopanje od razpona 10–20 mg/l DOC; metoda dodajanja; datum prvega dodajanja; spremembe,

— srednja starost blata in srednji hidravlični zadrževalni čas; metoda odstranjevanja odvečnega blata; metode za preprečevanje kopičenja, izgube blata itd.,

— uporabljene analitske tehnike,

— temperatura med preskusom,

— lastnosti kopičenja blata, volumski indeks blata (VIB), koncentracija aktivnega blata (MLSS),

— odstopanja od standardnih postopkov in okoliščine, ki bi lahko vplivale na rezultate.

Rezultati preskusa:

— vsi izmerjeni podatki (DOC, KPK, specifične analize, pH, temperatura, koncentracija kisika, suspendirane trdne snovi, dušikove snovi, če je ustrezno),

— vse izračunane vrednosti D_t (ali D_{tc}), D_B, D_{St} v tabelarni obliki in krivuljah odstranitve,

— informacije o fazi prilagajanja in fazi konstantne ravni, trajanju preskusa, stopnji odstranitve preskusne kemikalije in organskega medija v kontrolni enoti, statistične informacije ter izjave o biološki razgradljivosti in veljavnosti preskusa,

— obravnava rezultatov.

▼M4

VIRI:

(1) Swisher, R. D. (1987). „Surfactant Biodegradation“, 2. izdaja, Marcel Dekker Inc. New York, 1085 str.

(2) Nemška vlada (1962). Uredba o razgradljivosti detergentov v pralnih in čistilnih sredstvih. Bundesgesetzblatt, Pt. 1, št. 49: 698–706.

(3) Painter, H. A., in King, E. F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, Združeno kraljestvo.

(4) Painter, H. A., in King, E. F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

(5) Eckenfelder, W. W. (19), US EPA.

(6) Poglavje C.4 te priloge, Določanje „dobre“ biorazgradljivosti.

(7) Poglavje C.12 te priloge, Biorazgradnja – Spremenjeni SCAS preskus.

(8) Poglavje C.19 te priloge, Ocenjevanje adsorpcijskega koeficienta (K_{OC}) tal in odpadnega blata (blata iz čistilnih naprav) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

(9) Gerike, P., in Fischer, W. K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3: 157–173.

(10) Gerike, P., in Fischer, W. K. (1981), kot (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

(11) Painter, H. A., in Bealing, D. (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test, str. 113–138, V: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Ur. Jacobsen, B. N., Muntau, H., Angeletti, G.

(12) ISO 11733 (1995; revidiran 2004). Vrednotenje odstranjevanja in biorazgradljivosti organskih snovi v vodi – simulacijski preskus z aktivnim blatom.

(13) Birch, R. R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

(14) Birch, R. R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

(15) Gerike, P., Fischer, W. K., in Holtmann, W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat. Res. 14: 753–758.

(16) Baumann, U., Kuhn, G., in Benz, M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials, str. 91–98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Kakovost vode – Vrednotenje končne biorazgradljivosti organskih spojin v vodi. Metoda z analizo anorganskega ogljika v zaprtih posodah.

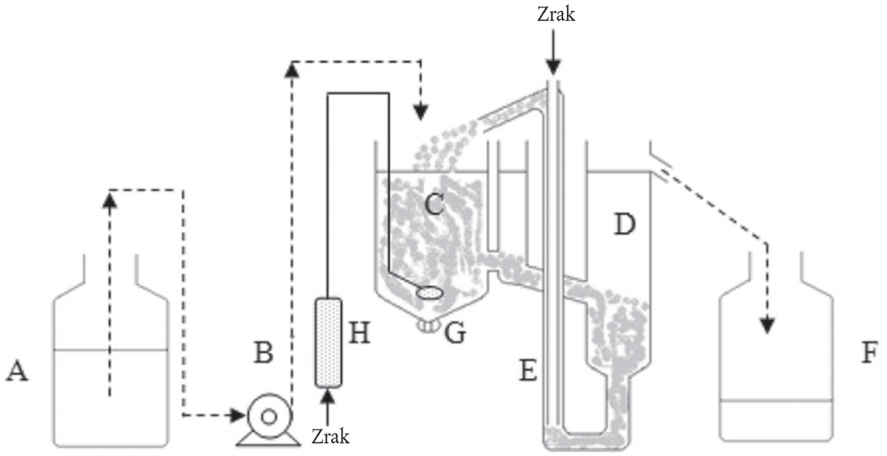
▼**M4**

Dodatek 1

Slika 1

Oprema za ocenjevanje biološke razgradljivosti

Husmannova enota



A. Posoda za shranjevanje

B. Dozirna črpalka

C. Prezračevalna komora (prostornina 3 l)

D. Usedalnik

E. Črpalka „airlift“

F. Zbiralna posoda

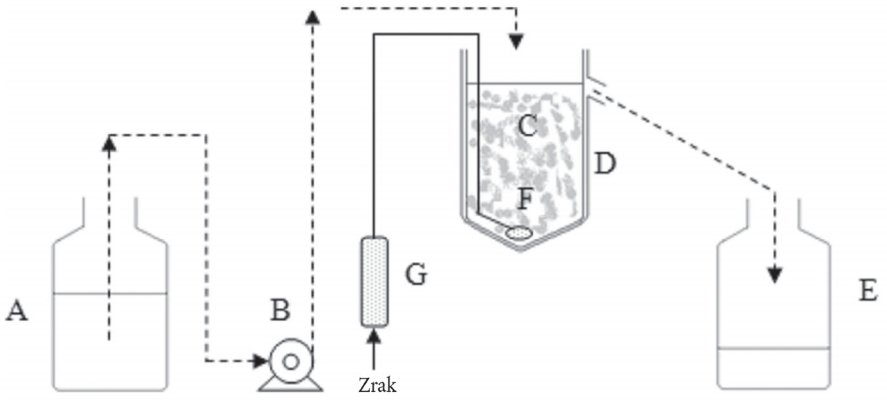
G. Prezračevalo

H. Merilnik pretoka zraka

Slika 2

Oprema za ocenjevanje biološke razgradljivosti

Porozna posoda



A. Posoda za shranjevanje

B. Dozirna črpalka

C. Porozna prezračevalna posoda

D. Zunanja neprepustna posoda

E. Zbiralna posoda

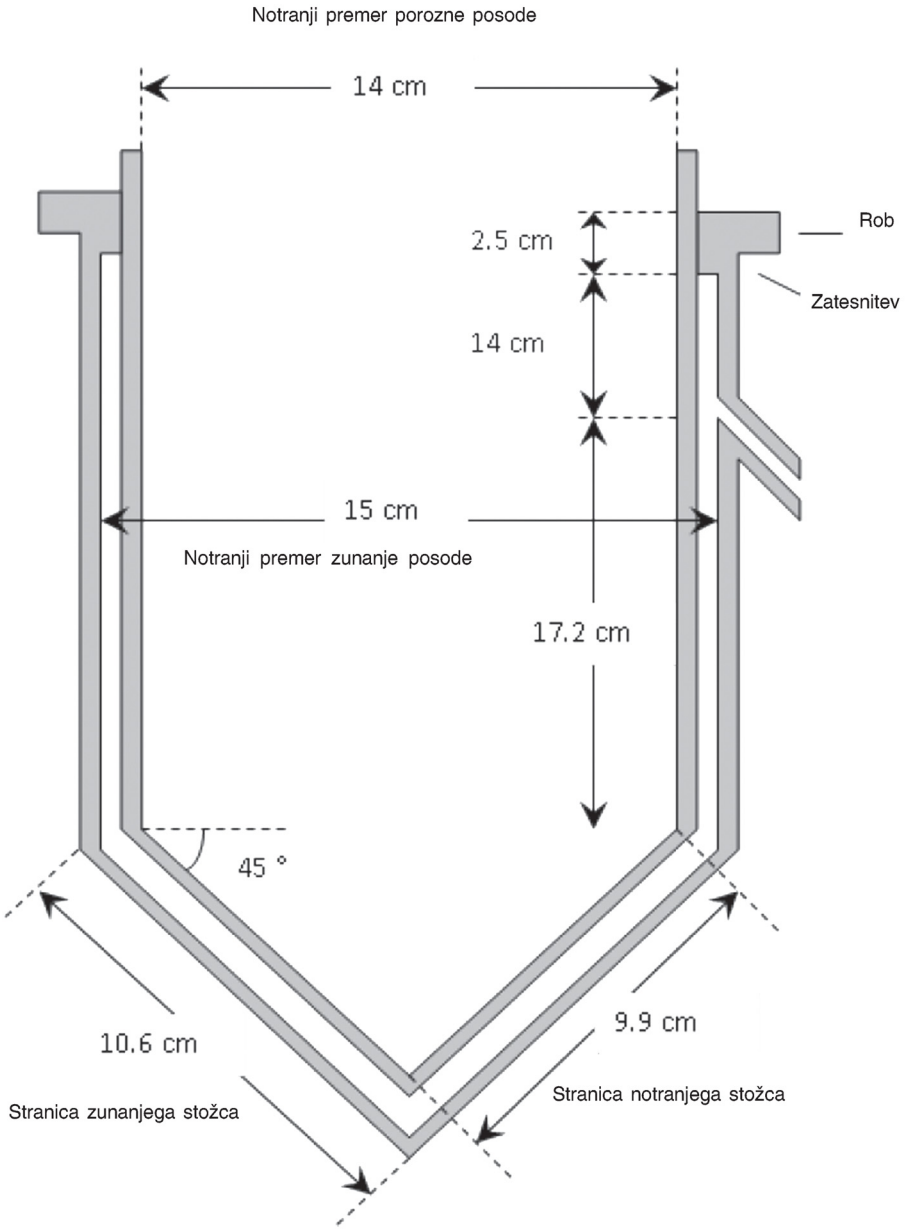
F. Difuzor

G. Merilnik pretoka zraka

▼M4

Slika 3

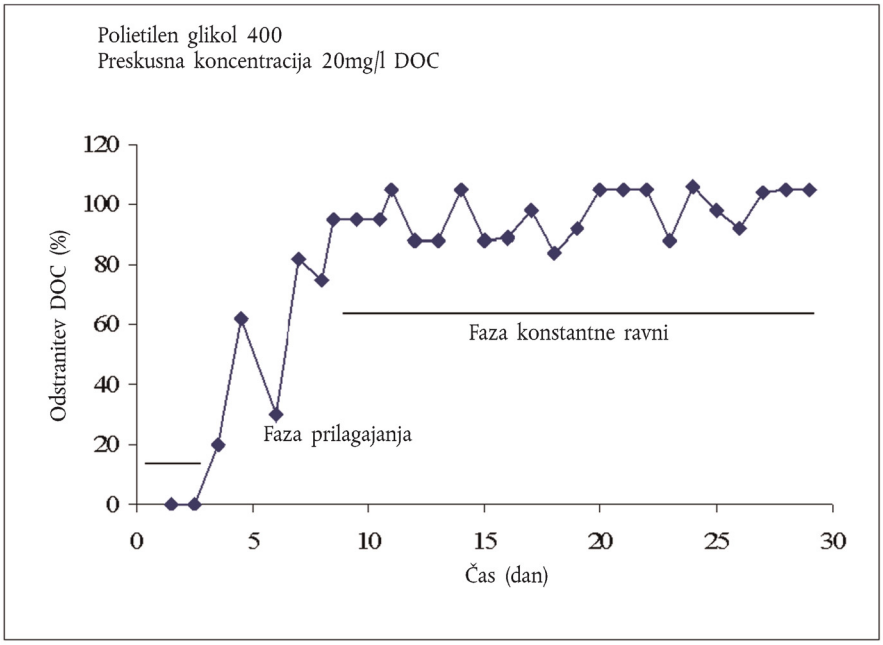
Podrobnosti o 3-litrski porozni prezračevalni posodi



▼**M4**

Dodatek 2

Primer krivulje odstranjevanja



▼M4

Dodatek 3

[INFORMATIVNO]

SPAJANJE PRESKUSNIH ENOT

Da bi poskušali izenačiti populacije mikrobov v blatu v preskusni enoti, v katero priteka odpadna voda s preskusno kemikalijo, in kontrolni enoti, v katero priteka samo odpadna voda, je bila uvedena dnevna izmenjava blata (1). Postopek je bil poimenovan spajanje, metoda pa je znana kot spojene enote. Spajanje se je sprva izvajalo s Husmannovimi enotami z aktivnim blatom, vendar pa se je izvajalo tudi z enotami poroznih posod (2) (3). Med rezultati nespojenih in spojenih enot ni bilo ugotovljenih bistvenih razlik, najsi so bile uporabljene Husmannove enote ali porozne posode, zato čas in energija, vložena v spajanje enot, ne prinašata nobenih koristi.

Izmenjave blata lahko ustvarijo videz precej velike odstranitve, ker se del preskusne snovi prenese in se koncentracije preskusne kemikalije v preskusnem in kontrolnem iztoku skoraj izenačijo. Zato je treba uporabiti korekcijske faktorje, ki so odvisni od izmenjanega deleža in srednjega hidravličnega zadrževalnega časa. Objavljenih je bilo več podrobnosti o izračunu (1).

Izračuna se popravljena stopnja odstranitve DOC ali KPK, za kar se uporabi splošna formula:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

pri čemer je:

D_{tc} = popravljeni odstotni delež odstranitve DOC ali KPK,

D_t = določeni odstotni delež odstranitve DOC ali KPK,

a = delež izmenjane količine med enotami z aktivnim blatom,

r = srednji hidravlični zadrževalni čas (h).

Če se na primer izmenja polovica količine aktivnega blata v prezračevalnem bazenu (a = 0,5) in je srednji hidravlični zadrževalni čas 6 h, je korekcijska formula naslednja:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

VIRI:

(1) Fischer, W., Gerike, P., Holtmann, W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

(2) Painter, H. A., Bealing, D. J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test, str. 113–138. V: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Ur. Jacobsen, B. N., Muntau, H., Angeletti, G.

(3) Painter, H. A., King, E. F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Združeno kraljestvo.

▼M4

Dodatek 4

VREDNOTENJE ZAVIRANJA AKTIVNEGA BLATA

Postopek s preskusnimi kemikalijami

1. Lahko se zgodi, da se kemikalija (ali odpadna voda) pri simulacijskem preskusu ne razgradi ali odstrani ter ima celo zaviralni učinek na mikroorganizme v blatu. Druge kemikalije se biološko razgradijo pri nizkih koncentracijah, pri višjih koncentracijah pa so zaviralne (hormeza). Zaviralni učinki se lahko pokažejo v zgodnejši fazi ali pa se določijo s preskusom strupenosti, pri katerem se uporabi inokulum, ki je podoben ali enak inokulumu, uporabljenemu pri simulacijskem preskusu (1). Take metode so zaviranje porabe kisika (poglavje C.11 te priloge (2) in ISO 8192 (3)) ali zaviranje rasti mikroorganizmov v blatu (ISO 15522 (4)).

2. Pri simulacijskem preskusu se zaviranje pokaže tako, da je razlika v raztopljenem organskem ogljiku (DOC) ali kemijski potrebi po kisiku (KPK) med iztokom iz preskusne posode in iztokom iz kontrolne enote večja od DOC, ki je dodan kot preskusna kemikalija. Z drugimi besedami, delež odstranitve DOC (in biokemijske potrebe po kisiku (BPK), kemijske potrebe po kisiku (KPK) in/ali NH^{+}_{4}) obdelanega organskega medija se zaradi preskusne kemikalije zmanjša. Če se to zgodi, je treba preskus ponavljati z zniževanjem koncentracije preskusne kemikalije, dokler ni dosežena raven, na kateri ni zaviranja, in morda z nadaljnjim zniževanjem koncentracije, dokler ni preskusna kemikalija biološko razgrajena. Če pa preskusna kemikalija (ali odpadna voda) negativno vpliva na proces pri vseh preskušenih koncentracijah, to nakazuje, da je kemikalijo težko, če ne celo nemogoče biološko obdelati, vendar pa bi bilo morda koristno preskus ponoviti z aktivnim blatom iz drugega vira in/ali omogočiti postopnejšo aklimatizacijo blata.

3. V nasprotnem primeru, če je preskusna kemikalija biološko odstranjena pri prvem poskusu v simulacijskem preskusu, je treba njeno koncentracijo povišati, če je treba vedeti, ali bi lahko bila zaviralna.

4. Ko se poskušajo določiti stopnje zaviranja, je treba upoštevati, da se lahko populacija aktivnega blata spreminja, tako da lahko sčasoma mikroorganizmi postanejo odporni proti zaviralni kemikaliji.

5. Izračun stopnje zaviranja:

   Skupni delež odstranitve R_o, BPK, DOC, KPK itd. za preskusno in kontrolno enoto se lahko izračuna z enačbo:

$$R_o = 100(I - E)/I\%$$

   pri čemer je:

   I = koncentracija BPK, DOC, KPK itd. v pritoku za preskusno ali kontrolno posodo (mg/l),

   E = zadevne koncentracije v iztoku (mg/l).

   I in E je treba popraviti za DOC zaradi preskusne kemikalije v preskusnih enotah, sicer bodo izračuni deleža zaviranja nepravilni.

▼**M4**

Stopnja zaviranja, ki jo povzroči preskusna kemikalija, se lahko izračuna z enačbo:

$$\% \text{ zaviranja} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

pri čemer je:

R_c = delež odstranitve v kontrolnih posodah,

R_t = delež odstranitve v preskusnih posodah.

VIRI:

(1) Reynolds, L., idr. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Poglavje C.11 te priloge, Biorazgradnja – Preskus zaviranja dihanja aktivnega blata.

(3) ISO 8192 (2007) Kakovost vode – Preskus inhibicije porabe kisika z aktivnim blatom za oksidacijo ogljika in amonija.

(4) ISO 15522 (1999) Kakovost vode – Določanje zaviralnega učinka sestavin vode na rast mikroorganizmov aktivnega blata.

▼M4

Dodatek 5

Slabo vodotopne preskusne kemikalije – hlapne kemikalije

Slabo vodotopne kemikalije

V zvezi z uporabo slabo vodotopnih in netopnih kemikalij v preskusih za simulacijo čiščenja odpadne vode je bilo objavljenih le malo poročil (1) (2) (3).

Ne obstaja ena sama metoda za dispergiranje preskusne kemikalije, ki bi se uporabljala za vse netopne kemikalije. Za poskus dispergiranja preskusnih kemikalij pri simulacijskem preskušanju bi se zdeli primerni dve od štirih metod, opisanih v ISO 10634 (4): uporaba emulgatorjev in/ali ultrazvoka. Ugotoviti je treba vsaj 24-urno stabilnost nastale disperzije. Primerno stabilizirane disperzije, ki se hranijo v zbiralniku s stalnim mešanjem (odstavek 38), se nato odmerijo v prezračevalni bazen ločeno od gospodinjske (ali sintetične) odpadne vode.

Če so disperzije stabilne, je treba preučiti, kako se lahko preskusna kemikalija določi v dispergirani obliki. DOC verjetno ne bo primeren, zato bo treba določiti posebno analitsko metodo za preskusno kemikalijo, ki jo bo mogoče uporabiti za iztoke, trdne snovi v iztoku in aktivno blato. Usoda preskusne kemikalije pri simulaciji procesa z aktivnim blatom bo nato določena v tekoči in trdni fazi. Določi se torej „masna bilanca“, na podlagi katere se ugotavlja, ali je bila preskusna kemikalija biološko razgrajena. Vendar bo to pomenilo samo primarno biološko razgradnjo. Končno biološko razgradnjo je treba poskusiti dokazati z respirometričnim preskusom za dobro biološko razgradljivost (poglavje C.4 te priloge (5), C, F ali D), pri katerem se kot inokulum uporabi blato, izpostavljeno preskusni kemikaliji v simulacijskem preskusu.

Hlapne kemikalije

Uporaba simulacij čiščenja odpadne vode za hlapne kemikalije je sporna in problematična. Podobno, kot pri slabo vodotopnih preskusnih kemikalijah, je bilo tudi o simulacijskih preskusih s hlapnimi kemikalijami objavljenih zelo malo poročil. Klasična naprava s popolnim premešanjem je prilagojena z zatesnitvijo prezračevalnega bazena in usedalnika, pri čemer se pretok zraka meri in nadzoruje z merilniki pretoka, izhodni plin pa prehaja skozi lovilnike za zbiranje hlapnih organskih snovi. V nekaterih primerih vakuumska črpalka usmeri izhodni plin skozi „hladni“ lovilnik ali lovilnik „izpihni in ujemi“, ki vsebuje Tenax ali silikagel za analize s plinsko kromatografijo. Preskusno kemikalijo v lovilniku je mogoče določiti analitično.

Preskus se izvaja v dveh delih. Enote najprej delujejo brez blata, vendar s sintetično odpadno vodo in preskusno kemikalijo, ki se črpa v prezračevalni bazen. Nekaj dni se zbirajo in analizirajo vzorci pritoka, iztoka in izhodnega plina, da se določi preskusna kemikalija. Na podlagi zbranih podatkov se lahko izračuna delež (R_{vs}) preskusne kemikalije, izločene iz sistema.

Nato se opravi običajni biološki preskus (z blatom) pri enakih obratovalnih pogojih kot pri raziskavi izločanja. Izmerita se tudi DOC ali KPK, s čimer se preveri učinkovitost delovanja enot. Opravijo se občasne analize, s katerimi se določi preskusna kemikalija v pritoku, iztoku in izhodnem plinu v prvem delu preskusa; po aklimatizaciji se analize izvajajo pogosteje. Tudi tu se lahko na podlagi podatkov v stabilnem stanju izračuna delež odstranitve preskusne kemikalije iz tekoče faze z vsemi procesi (R_T) (fizikalnimi in biološkimi) in tudi delež (R_V), izločen iz sistema.

▼M4

Izračun:

(a) Pri nebiološkem preskusu se lahko delež (R_{VP}) preskusne snovi, izločene iz sistema, izračuna z enačbo:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

pri čemer je:

R_{VP} = odstranitev preskusne kemikalije s hlapenjem (%),

S_{VP} = preskusna kemikalija, zbrana v lovilniku, izražena kot ekvivalent koncentracije v tekoči fazi (mg/l),

S_{IP} = koncentracija preskusne kemikalije v pritoku (mg/l).

(b) Pri biološkem preskusu se lahko delež (R_V) preskusne snovi, izločene iz sistema, izračuna z enačbo:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

pri čemer je:

R_V = odstranitev preskusne kemikalije sz uplinjanjem pri biološkem preskusu (%),

S_V = preskusna kemikalija, zbrana v lovilniku pri biološkem preskusu, izražena kot ekvivalent koncentracije v tekočem pritoku (mg/l),

S_I = koncentracija preskusne kemikalije v pritoku (mg/l).

(c) Pri biološkem preskusu je delež (R_T) preskusne kemikalije, odstranjene z vsemi procesi, podan z enačbo:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

pri čemer je:

S_E = koncentracija preskusne kemikalije v (tekočem) iztoku (mg/l).

(d) Delež (R_{BA}), odstranjen z biološko razgradnjo in adsorpcijo, se torej lahko izračuna z enačbo:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Opraviti je treba ločene preskuse, da bi ugotovili, ali je preskusna kemikalija adsorbirana; če je, se lahko izvede nadaljnji popravek.

(e) Primerjava med deležem preskusne kemikalije, izločene iz sistemov biološkega (R_v) in nebiološkega preskusa (R_{vp}), kaže splošni učinek, ki ga je biološka obdelava imela na emisijo preskusne kemikalije v ozračje.

Primer: benzen

Zadrževalni čas blata = 4 dni

Sintetična odpadna voda; zadrževalni čas = 8 ur

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Torej:

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % in R_{BA} = 85 %.

Za benzen se je domnevalo, da se ne adsorbira na blato.

VIRI:

(1) Horn, J. A., Moyer, J. E., Hale, J. H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

(2) Pitter, P., Chudoba, J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, ZDA.

(3) Stover, E. L., Kincannon, D. F (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Kakovost vode – Navodilo za pripravo in obdelavo v vodi slabo topnih organskih spojin za nadaljnje vrednotenje njihove biorazgradljivosti v vodi.

(5) Poglavje C.4 te priloge, Določanje „dobre“ biorazgradljivosti.

▼M4

Dodatek 6

Učinki zadrževalnega časa blata (SRT) na možnost obdelave kemikalij

UVOD

1. Metoda, opisana v glavnem besedilu, je bila zasnovana za ugotovitev, ali se lahko preskusne kemikalije (običajno tiste, za katere je znano, da so inherentno, vendar ne dobro biološko razgradljive) biološko razgradijo v okvirih, določenih v čistilnih napravah. Rezultati so izraženi v deležu odstranitve in deležu biološke razgradnje. Pogoji delovanja enot z aktivnim blatom in izbira pritoka omogočajo precej različne koncentracije preskusne kemikalije v iztoku. Preskusi se izvajajo pri samo eni nazivni koncentraciji trdnih snovi v blatu ali enem nazivnem zadrževalnem času blata (SRT), opisani sistemi odstranjevanja odvečnega blata pa lahko povzročijo velika nihanja vrednosti SRT med preskusom, in sicer od enega do drugega dne in tudi v enem dnevu.

2. V tej različici (1) (2) se SRT v celotnem 24-urnem obdobju vzdržuje v veliko ožjih mejah (tako, kot pri velikih sistemih), kar vodi do bolj konstantne koncentracije v iztokih. Priporoča se gospodinjska odpadna voda, ker omogoča doslednejše in večje deleže odstranitve. Preučijo se tudi učinki vrste vrednosti SRT, s podrobnejšim preučevanjem pa se lahko določijo učinki različnih temperatur na koncentracijo v iztoku.

3. Ni še splošnega soglasja o tem, kateri kinetični modeli delujejo pri biološki razgradnji kemikalij v pogojih čistilne naprave za odpadne vode. Za zbrane podatke je bil izbran Monodov model rasti bakterij in uporabe substrata (1) (2), saj je bila metoda namenjena samo uporabi za kemikalije, ki se proizvajajo v velikih količinah in so tako v odpadnih vodah prisotne v koncentracijah, višjih od 1 mg/l. Veljavnost poenostavljenega modela in izdelanih predpostavk je bila določena z nizom alkoholnih etoksilatov, ki imajo različne stopnje primarne biološke razgradljivosti (2) (3).

Opomba: v tej različici se večinoma natančno upošteva besedilo preskusne metode C.10-A, zato so v nadaljevanju navedene samo tiste podrobnosti, ki se razlikujejo.

NAČELO PRESKUSA

4. Enote poroznih posod z aktivnim blatom, zasnovane za olajšanje (skoraj) kontinuiranega odstranjevanja suspenzije aktivnega blata, ki omogoča zelo natančen nadzor nad zadrževalnim časom blata (SRT ali θ_s), obratujejo v nespojenem načinu pri različnih SRT in lahko tudi pri različnih temperaturah. Zadrževalni čas je običajno 2 do 10 dni, temperatura pa 5 do 20 °C. Odpadna voda, po možnosti gospodinjska, in raztopina preskusne kemikalije se ločeno odmerjata v enote s hitrostjo, s katero se dosežeta zahtevani zadrževalni čas odpadne vode (3 do 6 ur) in zahtevana koncentracija preskusne kemikalije v pritoku. Kontrolne enote, v katere se preskusna kemikalija ne dovaja, zaradi primerjave obratujejo vzporedno.

5. Uporabijo se lahko druge vrste naprav, vendar je treba zelo paziti, da se doseže dober nadzor nad SRT. Na primer, pri uporabi naprav, ki vključujejo usedalnik, bo morda treba upoštevati izgubo trdnih snovi prek iztoka iz naprave. Poleg tega je treba predvideti tudi posebne previdnostne ukrepe, da se preprečijo napake zaradi spreminjanja količine blata v usedalniku.

▼M4

6. Enote obratujejo pri vsakem izbranem nizu pogojev, in ko je doseženo ravnotežje, se v približno treh tednih dobijo povprečne koncentracije preskusne kemikalije v iztokih v stacionarnem stanju in (neobvezno) DOC. Poleg ocene deleža odstranitve preskusne kemikalije in (neobvezno) DOC je v grafični obliki izraženo razmerje med obratovalnimi pogoji naprave in koncentracijo v iztoku. Na podlagi tega poskusa se lahko izračunajo okvirne kinetične konstante in napovejo pogoji, v katerih se lahko preskusna kemikalija obdela.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

7. Uporabljata se odstavka 12 in 13 poglavja C.10-A.

RAVNI USPEŠNO OPRAVLJENEGA PRESKUSA

8. Uporabljata se odstavka 14 in 15 poglavja C.10-A.

REFERENČNA PRESKUSNA KEMIKALIJA

9. Uporablja se odstavek 16 poglavja C.10-A.

PONOVLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

10. Uporabljata se odstavka 17 in 18 poglavja C.10-A.

OPIS METODE

Naprava

11. Primerna enota je modificirani sistem poroznih posod (Dodatek 6.1). Sestavlja ga notranja posoda (ali vložek), narejena iz poroznega polipropilena debeline 3,2 mm in z velikostjo por približno 90 μm, stik pa je soležno čelno zvarjen. (Enota je tako bolj robustna kot tista, opisana v odstavku 21 tega poglavja C.10-A.) Vložek je vstavljen v neprepustno zunanjo posodo iz polietilena, ki je sestavljena iz dveh delov: krožnega podnožja, v katero so izvrtane luknje za dva voda za zrak in vod za odstranjevanje odvečnega blata, ter zgornjega valja, ki je z vijaki pritrjen na podnožje in ima odvod nameščen tako, da omogoča znano prostornino (3 l) v porozni posodi. Eden od vodov za zrak je opremljen z difuzorjem, drugi pa je odprt in postavljen pravokotno na difuzor v posodi. Ta sistem proizvaja potrebno vrtinčenje za zagotovitev, da je vsebina posode popolnoma premešana in da so zagotovljene koncentracije raztopljenega kisika, ki so večje od 2 mg/l.

12. Ustrezno število enot se vzdržuje pri nadzorovani temperaturi v razponu 5 do 20 °C (± 1 °C) bodisi v vodnih kopelih bodisi v prostorih s stalno temperaturo. Potrebni sta črpalki za odmerjanje raztopine preskusne kemikalije in usedenega blata v prezračevalne posode s potrebnim pretokom (0–1,0 ml/min oziroma 0–25 ml/min) ter tretja črpalka za odstranjevanje odpadnega blata iz prezračevalnih posod. Potreben zelo majhen pretok odpadnega blata se doseže s črpalko, ki je nastavljena na večji pretok in deluje v presledkih z uporabo časovnega stikala, npr. delovanje 10 sekund na minuto, pretok črpalke 3 ml/min, s čimer se doseže pretok odvečnega blata 0,5 ml/min.

Naprava za filtriranje ali centrifuga

13. Uporablja se odstavek 23 poglavja C.10-A.

Analitska oprema

14. Uporablja se odstavek 24 poglavja C.10-A.

Voda

▼M4

15. Uporabljata se odstavka 25 in 26 poglavja C.10-A.

Organski medij

16. Uporablja se odstavek 27 poglavja C.10-A.

Sintetična odpadna voda

17. Uporablja se odstavek 28 poglavja C.10-A.

Gospodinjska odpadna voda

18. Uporablja se odstavek 29 poglavja C.10-A.

Aktivno blato

19. Uporablja se odstavek 30 poglavja C.10-A.

Založne raztopine preskusne kemikalije

20. Uporabljata se odstavka 31 in 32 poglavja C.10-A.

POSTOPEK

Priprava inokuluma

21. Uporablja se samo odstavek 34 poglavja C.10-A – uporaba aktivnega blata (približno 2,5 g/l).

Število preskusnih enot

22. Pri preprostem preskusu, pri katerem se izmeri delež odstranitve, je potreben samo en SRT, da pa bi dobili podatke, potrebne za izračun okvirnih kinetičnih konstant, pa so potrebne 4 ali 5 vrednosti SRT. Običajno se izberejo vrednosti od 2 do 10 dni. Pripravno je izvesti preskus pri 4 ali 5 SRT sočasno pri eni temperaturi; pri obsežnejših raziskavah se iste vrednosti SRT ali morda različen razpon vrednosti uporabijo pri drugih temperaturah v razponu od 5 do 20 °C. Za primarno biološko razgradnjo (glavna uporaba) je običajno potrebna samo ena enota na niz pogojev. Vendar je za končno biološko razgradljivost za vsak niz pogojev potrebna kontrolna enota, v katero se dovaja odpadna voda, ne pa tudi preskusna kemikalija. Če se domneva, da je v uporabljeni odpadni vodi preskusna kemikalija, je treba pri oceni primarne biološke razgradnje uporabiti kontrolne enote in opraviti potrebne popravke v izračunih.

Odmerjanje organskega medija in preskusne kemikalije

23. Uporabljajo se odstavki 36 do 39 poglavja C.10-A, vendar je treba upoštevati, da se raztopina preskusne kemikalije odmerja ločeno in da se uporabljajo različni pretoki odvečnega blata. Pogosto je treba tudi spremljati in po potrebi prilagoditi – za ± 10 % – pretok pritokov, iztokov in odstranjevanja odvečnega blata, npr. dvakrat na dan. Če se pri uporabi gospodinjske odpadne vode pojavijo težave pri analitskih metodah, je treba preskus izvesti s sintetično odpadno vodo, vendar je treba zagotoviti, da različni mediji dajejo primerljive kinetične podatke.

Ravnanje z enotami z aktivnim blatom

24. Uporabljajo se odstavki 40 do 43 poglavja C.10-A, vendar je treba SRT nadzorovati samo s „konstantnim“ pretokom odvečnega blata.

Vzorčenje in analiza

25. Uporabljajo se odstavki 44 do 50 poglavja C.10-A, le da je treba določiti koncentracijo preskusne kemikalije, poljubno pa tudi DOC; KPK naj se ne bi uporabljal.

▼M4

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

26. Uporabljajo se odstavki 52 do 54 poglavja C.10-A.

Izražanje rezultatov preskusa

27. Uporabljajo se odstavki 56 do 62 poglavja C.10-A.

Izračun kinetičnih konstant

28. Realneje je navesti srednjo koncentracijo preskusne kemikalije v iztoku v stacionarnem stanju in opisati, kako se spreminja glede na obratovalne pogoje v napravi, kot navesti delež primarne biološke razgradnje. To se lahko stori z enačbo (6) iz Dodatka 6.2, s katero lahko dobimo vrednosti za K_S, μ_m in θ_{SC}, kritični zadrževalni čas blata.

(Približne vrednosti K_S in μm se lahko dobijo tudi s preprostim računalniškim programom, ki teoretično krivuljo, izračunano z enačbo 2 (Dodatek 6.2), prilagodi dobljenim poskusnim vrednostim. Čeprav nobena dana rešitev ne bo edinstvena, je mogoče dobiti razumen približek K_S in μ_m.)

Variabilnost rezultatov

29. Iz izkušenj je znano, da se za posamezne kemikalije dobijo variabilne vrednosti kinetičnih parametrov. Domneva se, da pogoji, v katerih je bilo blato gojeno, in pogoji, ki vladajo pri uporabljenem preskusu (kot v odstavku 5 in pri drugih preskusih), zelo vplivajo na dobljene vrednosti. En vidik te variabilnosti so obravnavali Grady idr. (4), ki so predlagali, da je treba za dvoje skrajnih stanj, ki predstavljata meje fiziološkega stanja, ki ga kultura lahko doseže med kinetičnim poskusom, uporabiti izraza „obstoječe“ in „intrinzično“ uporabiti za dvoje skrajnih pogojev, Če se stanje med preskusom ne sme spremeniti, vrednosti kinetičnega parametra izražajo pogoje v okolju, iz katerega so bili mikroorganizmi vzeti; te vrednosti se imenujejo „obstoječe“ ali trenutne. V drugem skrajnem primeru, če so pogoji pri preskusu taki, da omogočajo popoln razvoj sistema za sintezo beljakovin, ki omogoča največjo mogočo hitrost rasti, se za dobljene kinetične parametre šteje, da so „intrinzični“, ter so odvisni samo od narave substrata in vrst bakterij v kulturi. Na primer, obstoječe vrednosti bodo dobljene z ohranjanjem nizkega razmerja med koncentracijo substrata in kompetentnimi mikroorganizmi (S_o/X_o), npr. 0,025, intrinzične vrednosti pa nastopajo, ko je to razmerje visoko, npr. vsaj 20. V obeh primerih mora biti S_o enak ustrezni vrednosti konstante polovičnega nasičenja Ks ali jo presegati.

30. Variabilnost in druge plati kinetike biološke razgradnje so bile obravnavane na nedavni delavnici SETAC (5). Iz takih raziskav, objavljenih in načrtovanih, bi moral izhajati jasnejši pogled na kinetiko, ki deluje v čistilnih napravah, da bi bilo mogoče bolje razlagati podatke in predlagati ustreznejše načrte za prihodnje preskusne metode.

VIRI:

(1) Birch, R. R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

(2) Birch, R. R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

(3) Birch, R. R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

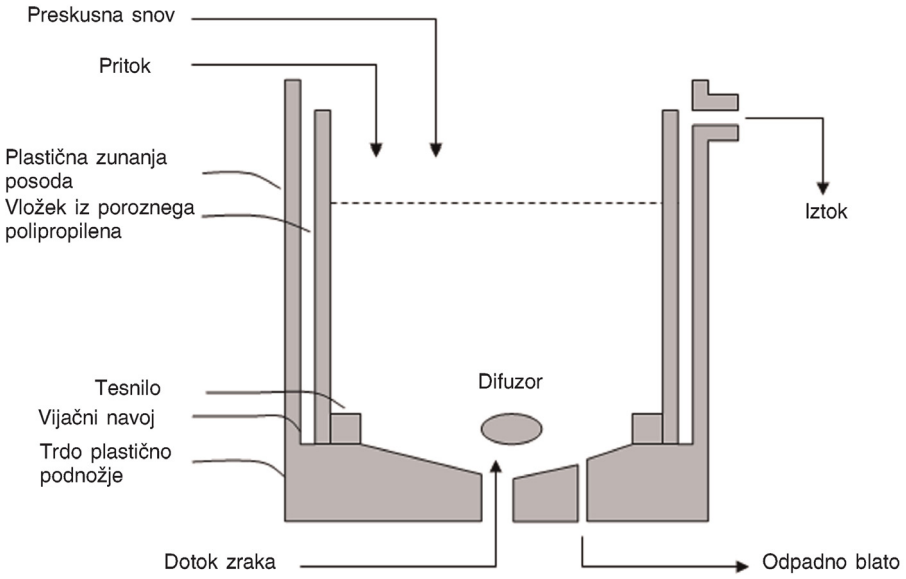
(4) Grady, C. P. L, Smets, B. F., in Barbeau, D. S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Delavnica v Port Sunlightu, ZK. Ur. Hales, S. G., Feitjel, T., King, H., Fox, K., Verstraete, W., 4.–6. sept. 1996. SETAC Europe, Bruselj.

▼**M4**

Dodatek 6.1

Porozna posoda z nadzorom SRT



▼M4

Dodatek 6.2

Izračun kinetičnih konstant

1. Ob predpostavki, da se uporablja Monodova kinetika, in ob upoštevanju masne bilance aktivnih trdnih snovi in substrata v sistemu z aktivnim blatom (1) je mogoče dobiti naslednji enačbi, ki opisujeta stacionarno stanje:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ali

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

pri čemer je:

S_1 = koncentracija substrata v iztoku (mg/l),

K_S = konstanta polovičnega nasičenja, koncentracija, pri kateri $\mu = \mu_m/2$ (mg/l),

μ = specifična hitrost rasti (d^{-1}),

μ_m = največja vrednost μ_m (d^{-1}),

K_d = specifična hitrost odmiranja aktivnih trdnih snovi (d^{-1}),

θ_S = srednji zadrževalni čas blata, SRT (d).

Preučitev te enačbe vodi do naslednjih ugotovitev:

(i) koncentracija v iztoku je neodvisna od koncentracije v pritoku (S_0); zato se delež biološke razgradnje spreminja s koncentracijo v pritoku S_0;

(ii) edini parameter nadzora naprave, ki vpliva na S_1, je zadrževalni čas blata θ_S;

(iii) za dano koncentracijo v pritoku S_0 obstaja kritični zadrževalni čas blata, tako da velja:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

pri čemer je:

θ_{SC} = kritični zadrževalni čas blata, pred potekom katerega so mikroorganizmi odplaknjeni iz naprave;

(iv) ker so drugi parametri v enačbi (2) povezani s kinetiko rasti, temperatura verjetno vpliva na raven substrata v iztoku in kritično starost blata, tj. zadrževalni čas blata, potreben za dosego določene stopnje obdelave, bi se z zniževanjem temperature povečeval.

2. Iz masne bilance trdnih snovi v sistemu poroznih posod in ob predpostavki, da je koncentracija trdnih snovi v iztoku iz naprave X_2 nizka v primerjavi s koncentracijo v prezračevalni posodi X_1, je zadrževalni čas blata:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

in

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

pri čemer je:

V = prostornina prezračevalne posode (l),

X_1 = koncentracija trdnih snovi v prezračevalni posodi (mg/l),

X_2 = koncentracija trdnih snovi v iztoku (mg/l),

Q_0 = pretok pritoka (l/d),

Q_1 = pretok odpadnega blata (l/d).

Zadrževalni čas blata je torej pri kateri koli predhodno izbrani vrednosti mogoče nadzorovati z nadzorom nad pretokom odvečnega blata Q_1.

Sklepne ugotovitve

3. Glavni namen preskusa je torej omogočiti napovedovanje koncentracije v iztoku in s tem ravni preskusne kemikalije v vodi, v katero se dovaja.

4. Z grafičnim prikazom S_1 v odvisnosti od θ_S je mogoče včasih takoj oceniti kritični zadrževalni čas blata θ_{SC}, npr. krivulja 3 na sliki 1. Če to ni mogoče, se θ_{SC}, skupaj s približnima vrednostma μ_m in K_S, lahko izračuna z grafičnim prikazom S_1 v odvisnosti od $S_1 \bullet \theta_S$.

Enačba (1) se preoblikuje takole:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Če je K_d majhen, potem $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ in [5] se spremeni v naslednjo enačbo:

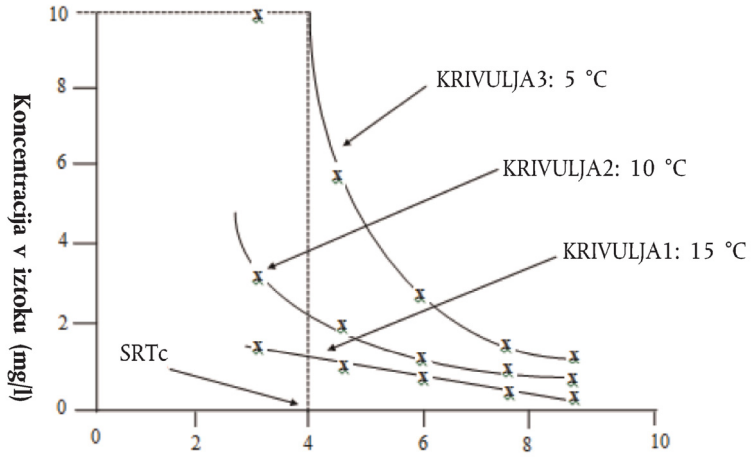
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Grafični prikaz bi torej moral biti ravna črta (glej sliko 2) z naklonom $1/\mu_m$ in sečiščem K_S/μ_m; tudi $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

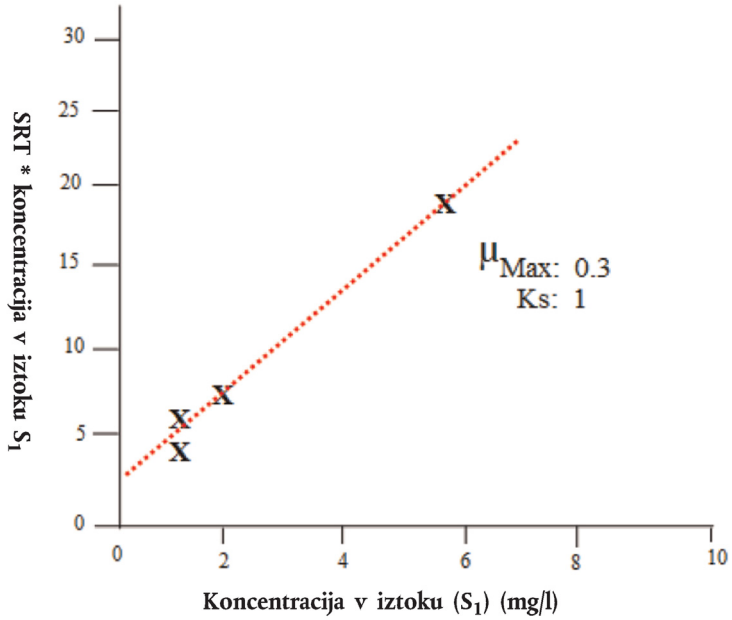
Slika 1

Tri temperature; pet SRT



Slika 2

Regresijska premica SRT · S_1 v odvisnosti od S_1 pri T = 5 °C



Glosar:

Koncentracija v iztoku

Krivulja

▼M4

Dodatek 7

PRESKUS PRI NIZKIH KONCENTRACIJAH (μg/l)

1. Številne kemikalije so običajno v vodnem okolju in celo v odpadnih vodah v zelo nizkih koncentracijah (μg/l). Pri takih koncentracijah verjetno ne delujejo kot primarni substrati za rast, ampak se verjetneje razgradijo kot sekundarni substrati, ki ne posredujejo pri rasti, sočasno z vrsto naravno prisotnih ogljikovih snovi. Posledično razgradnja takih kemikalij ni primerna za model, opisan v Dodatku 6. Uporabiti bi bilo mogoče številne modele, v pogojih, ki vladajo v sistemih za čiščenje odpadnih voda, pa lahko sočasno deluje več kot en model. Za osvetlitev te težave bo potrebnih veliko več raziskav.

2. Medtem se lahko uporablja postopek, naveden v glavnem besedilu (poglavje C.10-A), vendar samo za primarno biološko razgradljivost, pri čemer se uporabijo primerno nizke koncentracije (< 100 μg/l) in potrjen analitski postopek. Delež biološke razgradnje se lahko izračuna (glej odstavek 54 preskusne metode), če se upoštevajo abiotični procesi (adsorpcija, hlapnost itd.). Primer je raziskava Nyholma in njegovih sodelavcev (1) (2), pri kateri je bil uporabljen 4-urni ciklus v sistemu „napolni in izprazni“. Poročali so o konstantah psevdo prvega reda za 5 kemikalij, dodanih v sintetično odpadno vodo pri koncentraciji 5 do 100 μg/l. (Za dokončno biološko razgradljivost se lahko uporabijo preskusne kemikalije, označene s ^{14}C.) Opis tega presega obseg uporabe te preskusne metode, saj za zdaj še ni dogovorjenih postopkov, čeprav predlagana metoda za standard ISO 14592 (3) vsebuje navodilo za uporabo kemikalij, označenih s ^{14}C.

Preskus SCAS

3. Pozneje je bil predlagan preprostejši dvostopenjski preskus (4) (5) (6); metodi polkontinuiranega aktivnega blata (SCAS) sledijo kratkoročni kinetični preskusi na vzorcih, odvzetih iz enot SCAS. Sistem SCAS deluje z znanimi hitrostmi odstranjevanja odvečnega blata (v nasprotju s prvotno preskusno metodo iz poglavja C.12), vanj pa se dovaja spremenjena sintetična odpadna voda OECD ali gospodinjska odpadna voda. Sintetična odpadna voda je bila spremenjena (zaradi spremenljive vrednosti pH in slabe usedljivosti blata) z dodatkom fosfata kot puferja, kvasnega ekstrakta, železovega (III) klorida in soli elementov v sledovih, njen COD pa je bil povečan na približno 750 mg/l s povečanjem koncentracije peptona in mesnega ekstrakta. Enote so delovale v 24-urnem ciklu: prezračevanje 23 ur, odstranjevanje odvečnega blata, usedanje, odvzem supernatanta (iztok), ki jim sledi dodajanje sintetične odpadne vode in preskusne kemikalije do 100 μg/l (tj. pri približno enaki koncentraciji kot pri kratkoročnem preskusu). Enkrat tedensko je bilo 10 % vsega blata nadomeščenih s svežim blatom, da se je ohranila uravnotežena mikrobna populacija.

4. Koncentracije preskusne kemikalije se izmerijo na začetku in koncu prezračevanja, preskus pa se nadaljuje, dokler ni doseženo konstantno odstranjevanje preskusne kemikalije; to traja od enega tedna do več mesecev.

Kratkoročni preskus

5. Kratkoročni preskus (npr. 8 ur) se uporabi za določitev konstante kinetike (psevdo) prvega reda za razgradnjo preskusne kemikalije v aktivnem blatu znanega, a različnega izvora in razvoja. Zlasti se vzorci blata vzamejo iz reaktorjev SCAS – ob koncu prezračevalnega obdobja, ko je koncentracija organskega substrata nizka – med potekom poskusa aklimatizacije (odstavka 3 in 4). Blato se za primerjavo lahko vzame tudi iz vzporedne enote SCAS, ki ni bila izpostavljena preskusni kemikaliji. Mešanice blata in preskusne kemikalije, dodane pri dveh ali več koncentracijah v razponu 1–50 μg/l, se prezračijo,

▼M4

ne da bi se dodala sintetična odpadna voda ali drug organski substrat. Preskusna kemikalija, ki ostane v raztopini, se določa v rednih presledkih, npr. vsako uro, odvisno od razgradljivosti kemikalije, vendar ne več kot 24 ur. Vzorci se pred ustrezno analizo centrifugirajo.

Izračuni

6. Podatki iz enot SCAS se uporabijo za izračun deleža odstranitve preskusne kemikalije (odstavek 54). Izračuna se lahko tudi povprečna hitrostna konstanta K_1 (normalizirana za koncentracijo suspendiranih trdnih snovi), za kar se uporabi enačba:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

pri čemer je:

t = čas prezračevanja (23h),

C_e = koncentracija ob koncu prezračevalnega obdobja (μg/l),

C_i = koncentracija na začetku prezračevanja (μg/l),

SS = koncentracija trdnih snovi v aktivnem blatu (g/l).

7. Pri kratkoročnem preskusu se log% preostale koncentracije grafično prikaže v odvisnosti od časa, naklon začetnega dela (10–50-odstotna razgradnja) krivulje pa je enak K_1, konstanti (psevdo) prvega reda. Konstanta se normalizira glede na koncentracijo trdnih snovi v blatu z delitvijo naklona s koncentracijo trdnih snovi v blata. Prikazani rezultat mora vključevati tudi podrobnosti o začetnih koncentracijah preskusne kemikalije in trdnih snovi, zadrževalnem času blata, nalaganju blata in viru ter podrobnosti o (morebitni) predhodni izpostavljenosti preskusni kemikaliji.

Variabilnost rezultatov

8. Variabilnost in druge plati kinetike biološke razgradnje so bile obravnavane na nedavni delavnici SETAC (7). Iz takih raziskav, objavljenih in načrtovanih, bi moral izhajati jasnejši pogled na kinetiko, ki deluje v čistilnih napravah, da bi bilo mogoče bolje razlagati podatke in predlagati ustreznejše načrte za prihodnje preskusne metode.

VIRI:

(1) Nyholm, N., Jacobsen, B. N., Pedersen, B. M., Poulsen, O., Dambourg, A., in Schultz, B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

(2) Jacobsen, B. N., Nyholm, N., Pedersen, B. M., Poulsen, O., in Ostfeldt, P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Kakovost vode – Vrednotenje aerobne biorazgradljivosti organskih spojin pri nizkih koncentracijah v vodi.

▼**M4**

(4) Nyholm, N., Ingerslev, F., Berg, U. T., Pedersen, J. P., in Frimer-Larsen, H. (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

(5) Berg, U. T., in Nyholm, N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N., Berg, U. T., Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Köbenhavn.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Delavnica v Port Sunlightu, Združeno kraljestvo. Ur. Hales, S. G, Feitjel, T., King, H., Fox, K., in Verstraete, W., 4.–6. sept. 1996. SETAC Europe, Bruselj.

▼M4

C.10-B: Biofilmi

UVOD

1. Simulacijski preskusi se običajno uporabljajo za kemikalije, ki niso uspešno opravile presejalnega preskusa za dobro biološko razgradljivost (poglavje C.4-A do F te priloge (9)), vendar so uspešno opravile preskus za inherentno biološko razgradljivost. Simulacijski preskusi se izjemoma uporabijo tudi za kemikalijo, o kateri je potrebnih več informacij, zlasti za kemikalije, ki se proizvajajo v velikih količinah; običajno se uporabi preskus z aktivnim blatom (C.10-A). Vendar pa so v nekaterih okoliščinah potrebne posebne informacije o odzivanju kemikalije na metode čiščenja odpadne vode, ki vključujejo biofilme, to so precejalniki, rotirajoči biološki kontaktorji in reaktorji s tehnologijo vrtinčnih plasti. Za izpolnitev te potrebe so bile razvite različne naprave.

2. Gerike idr. (1) so uporabili velike precejalnike v pilotnem merilu, ki so delovali v spojenem načinu. Ti filtri so zavzeli veliko prostora in zahtevali razmeroma veliko odpadne vode ali sintetične odpadne vode. Truesdale idr. (2) so opisali manjše filtre (premer 1,83 × 1,83 metra), v katere so dovajali naravno odpadno vodo brez površinsko aktivnih snovi, vendar so bile še vedno potrebne razmeroma velike količine. Za nastanek „zrelega“ biofilma je bilo potrebnih kar 14 tednov, dodatnih 4 do 8 tednov pa je bilo potrebnih za začetek aklimatizacije po prvem vnosu preskusne površinsko aktivne snovi.

3. Baumann idr. (3) so razvili mnogo manjši filter, za katerega so kot nosilni inertni medij uporabili umetno volno iz poliestra, predhodno namočeno v aktivno blato. Preskusna kemikalija je bila uporabljena kot edini vir ogljika, biološka razgradljivost pa je bila ocenjena na podlagi meritev raztopljenega organskega ogljika (DOC) v pritoku in iztoku ter količine CO_2 v izhodnem plinu.

4. Precej drugačen pristop so uporabili Gloyna idr. (4), ki so izumili rotirajoči cevni reaktor. Na notranji površini rotirajoče cevi so na znani površini vzgojili biofilm, tako da so z vrha cevi, ki je bila pod majhnim kotom nagnjena glede na vodoravno površino, spuščali pritok. Reaktor se je uporabljal za preučevanje biološke razgradljivosti površinsko aktivnih snovi (5), pa tudi za preučevanje optimalne debeline biofilma in difuzije prek njega (6). Slednji avtorji so reaktor razvijali dalje, med drugim so ga spremenili tako, da je mogoče določiti CO_2 v izhodnem plinu.

5. Stalni odbor analitikov (Združeno kraljestvo) je rotirajoči cevni reaktor sprejel kot standardno metodo za oceno biološke razgradljivosti kemikalij (7), možnosti čiščenja odpadnih voda in njihove strupenosti (8). Prednosti opisane metode so preprostost, pripravnost, ponovljivost in potrebne razmeroma majhne količine organskega medija.

NAČELO PRESKUSA

6. Sintetična ali gospodinjska odpadna voda in preskusna kemikalija se v mešanici ali posamezno naneseta na notranjo površino počasi rotirajoče nagnjene cevi. Na notranji površini se ustvari plast mikroorganizmov, podobnih mikroorganizmom na mediju biološkega filtra. Izberejo se pogoji delovanja reaktorja, da se doseže ustrezna odstranitev organske snovi in po potrebi oksidacija amonija.

▼M4

7. Iztok iz cevi se zbere in pusti, da se usede, in/ali filtrira pred analizo za določitev raztopljenega organskega ogljika (DOC) in/ali preskusne kemikalije s posebno metodo. Kontrolne enote, v katere se preskusna kemikalija ne dovaja, zaradi primerjave obratujejo vzporedno v enakih pogojih. Domneva se, da razlika med koncentracijami DOC v iztoku iz preskusne in kontrolne enote nastane zaradi preskusne kemikalije in njenih organskih metabolitov. Ta razlika se primerja s koncentracijo dodane preskusne kemikalije (kot DOC), da se izračuna odstranitev preskusne kemikalije.

8. Biološko razgradnjo je običajno mogoče ločiti od biološke adsorpcije s skrbno preučitvijo časovne krivulje odstranitve. Običajno jo je mogoče potrditi s preskusom dobre biološke razgradljivosti (poraba kisika ali nastajanje ogljikovega dioksida), pri katerem se uporabi aklimatizirani inokulum, ob koncu preskusa vzet iz reaktorjev, v katere se dovaja preskusna kemikalija.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

9. Za pravilno razlago rezultatov morajo biti znani čistost, vodotopnost, hlapnost in adsorpcijske lastnosti preskusne kemikalije.

10. Običajno hlapnih in slabo topnih kemikalij ni mogoče preskusiti, če se ne sprejmejo posebni previdnostni ukrepi (glej Dodatek 5 k poglavju C.10-A). Za izračun teoretičnih vrednosti in/ali preverjanje izmerjenih vrednosti parametrov, npr. teoretične potrebe po kisiku (TPK) in DOC, je treba poznati tudi kemično strukturo ali vsaj empirično formulo.

11. Informacije o strupenosti preskusne kemikalije za mikroorganizme (glej Dodatek 4 k poglavju C.10-A) so lahko uporabne za izbiro primernih preskusnih koncentracij in so lahko bistvene za pravilno razlago nizkih vrednosti biološke razgradljivosti.

RAVNI USPEŠNO OPRAVLJENEGA PRESKUSA

12. Prvotno se je zahtevalo, da primarna biološka razgradnja površinsko aktivnih snovi doseže 80 % ali več, preden se lahko kemikalija da na trg. Če 80-odstotna vrednost ni dosežena, se lahko uporabi ta simulacijski (potrditveni) preskus, površinsko aktivna snov pa se lahko da na trg samo, če je odstranjenih več kot 90 % določene kemikalije. Pri kemikalijah na splošno ni dvoma o uspešno ali neuspešno prestanem preskusu, dobljena vrednost odstranjenega odstotnega deleža pa se lahko uporabi v približnih izračunih verjetne okoljske koncentracije, ki se uporablja pri ocenah nevarnosti, ki jo pomenijo kemikalije. V vrsti raziskav čistih kemikalij je bilo ugotovljeno, da je bil delež odstranitve DOC > 90-odstotni pri več kot treh četrtinah in > 80-odstotni pri več kot 90 % kemikalij, ki so pokazale kakršno koli pomembno stopnjo biološke razgradljivosti.

REFERENČNE KEMIKALIJE

13. Za zagotovitev pravilnega izvajanja poskusnega postopka je občasno koristno preskusiti referenčne kemikalije, katerih obnašanje je znano. Med takimi kemikalijami so adipinska kislina, 2-fenilfenol, 1-naftol, difenil-2,2-dikarboksilna kislina, 1-karboksi naftalenska kislina itd. (9) (10) (11).

PONOVLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

14. Po ugotovitvah laboratorija iz Združenega kraljestva je relativni standardni odklon v preskusih 3,5-odstotni, med preskusi pa 5-odstotni (7).

▼M4

OPIS METODE

Naprava

Rotirajoči cevni reaktorji

15. Naprava (glej sliki 1 in 2 v Dodatku 8) je sestavljena iz niza akrilnih cevi z dolžino 30,5 cm in notranjim premerom 5 cm, oprtih na kolesca z gumijastim robom v kovinskem nosilnem okvirju. Vsaka cev ima zunanji rob, globok približno 0,5 cm, ki jo drži na kolescih, notranja površina je bila hrapavljena z grobo žičnato volno, na zgornjem (dovodnem) koncu pa je 0,5 cm globok notranji rob, ki zadržuje tekočino. Cevi so nagnjene pod kotom približno 1 stopinje glede na vodoravno površino, da se doseže potrebni kontaktni čas, ko je preskusni medij vnesen v čisto cev. Kolesca z gumijastim robom poganja motor s počasno spremenljivo hitrostjo. Temperatura cevi se nadzoruje s postavitvijo v prostor s konstantno temperaturo.

16. Z vstavitvijo vsakega cevnega reaktorja v nekoliko večjo cev, zaprto s pokrovom, ter zagotovitvijo, da so stiki neprepustni za plin, je mogoče v bazični raztopini zbrati izhodni CO_2 za nadaljnje meritve (6).

17. 24-urna zaloga organskega medija z dodano preskusno kemikalijo, če je ustrezno, za vsako cev je shranjena v 20-litrski posodi za shranjevanje (A) (glej sliko 2). Raztopina preskusne kemikalije se po potrebi lahko odmerja ločeno. Pri dnu vsake posode za shranjevanje je izhod, ki je s cevjo iz primernega materiala, npr. silikonske gume, prek peristaltične črpalke (B) povezan s stekleno ali akrilno dovodno cevjo, ki je potisnjena 2–4 cm v notranjost višjega (dovodnega) konca nagnjene cevi (C). Iztok kaplja iz spodnjega konca nagnjene cevi in se zbira v drugi posodi za shranjevanje (D). Pred analizo se usede ali filtrira.

Naprava za filtriranje ali centrifuga

18. Naprava za filtriranje vzorcev z membranskimi filtri ustrezne poroznosti (nazivni premer odprtine 0,45 μm), ki adsorbirajo organske kemikalije ali sprostijo čim manj organskega ogljika. Če se uporabljajo filtri, ki sproščajo organski ogljik, jih je treba skrbno sprati z vročo vodo, da se odstrani izlužljivi organski ogljik. Namesto tega se lahko uporabi centrifuga, ki lahko doseže 40 000 m/s^2.

19. Analitska oprema za določanje:

— DOC/celotnega organskega ogljika (TOC) ali kemijske potrebe po kisiku (KPK),

— določene kemikalije (HPLC, GC itd.), če se to zahteva,

— vrednosti pH, temperature, kislosti, bazičnosti,

— amonija, nitrita, nitrata, če se preskus izvaja v nitrifikacijskih pogojih.

Voda

20. Vodovodna voda, ki vsebuje manj kot 3 mg/l DOC.

21. Destilirana ali deionizirana voda, ki vsebuje manj kot 2 mg/l DOC.

▼M4

Organski medij

22. Kot organski medij so lahko uporabijo sintetične odpadne vode, gospodinjske odpadne vode ali mešanica obojih. Izkazalo se je, da je pri uporabi samo gospodinjske odpadne vode delež odstranitve DOC pogosto večji (v enotah z aktivnim blatom) in da celo omogoča biološko razgradnjo nekaterih kemikalij, ki se biološko ne razgradijo, kadar se uporabi sintetična odpadna voda OECD. Zato se priporoča uporaba gospodinjske odpadne vode. Koncentracijo DOC (ali KPK) je treba izmeriti v vsaki novi šarži organskega medija. Kislost ali bazičnost organskega medija mora biti znana. Mediju bo morda treba dodati primeren pufer (natrijev hidrogen karbonat ali kalijev hidrogen fosfat), če je njegova kislost ali bazičnost nizka, da se med preskusom vrednost pH v reaktorju ohranja pri približno 7,5 ± 0,5. O količini puferja, ki jo je treba dodati, in času, ko ga je treba dodati, je treba odločiti v vsakem primeru posebej.

Sintetična odpadna voda

23. V vsakem litru vodovodne vode je treba raztopiti: 160 mg peptona; 110 mg mesnega ekstrakta; 30 mg sečnine; 28 mg brezvodnega dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4); 7 mg natrijevega klorida (NaCl); 4 mg kalcijevega klorid dihidrata ($CaCl_2.2H_2O$) in 2 mg magnezijevega sulfat heptahidrata ($Mg_2SO_4.7H_20$). Ta sintetična odpadna voda OECD je primer in predstavlja srednjo koncentracijo DOC v pritoku, tj. približno 100 mg/l. Uporabijo se lahko tudi druge sestave s približno enakimi koncentracijami DOC, ki so bolj podobne pravi odpadni vodi. Ta sintetična odpadna voda se lahko pripravi v destilirani vodi v koncentrirani obliki in shranjuje največ en teden pri približno 1 °C. Po potrebi se razredči z vodovodno vodo. (Ta medij je nezadovoljiv, npr. koncentracija dušika je zelo visoka, vsebnost ogljika je razmeroma nizka, vendar ni bilo boljšega predloga, razen, naj se doda več fosfata kot puferja in več peptona.)

Gospodinjska odpadna voda

24. Uporabiti je treba svežo usedeno odpadno vodo, ki se dnevno zbira iz čistilne naprave, v katero se dovaja pretežno gospodinjska odpadna voda. Zbrati jo je treba iz prelivnega kanala primarnega usedalnika ali vtoka v čistilno napravo z aktivnim blatom, biti pa mora večinoma brez grobih delcev. Odpadna voda se lahko uporabi po večdnevnem shranjevanju pri približno 4 °C, če je dokazano, da se DOC (ali KPK) med shranjevanjem ni bistveno zmanjšal (tj. za manj kot 20 %). Da se omejijo motnje v sistemu, je treba DOC (ali KPK) vsake nove šarže pred uporabo uravnati na ustrezno konstantno vrednost, npr. z redčenjem z vodovodno vodo.

Mazivo

25. Za mazanje valjčkov peristaltične črpalke se lahko uporablja glicerol ali oljčno olje: oba sta primerna za uporabo pri ceveh iz silikonske gume.

Založne raztopine preskusne kemikalije

26. Za kemikalije z ustrezno topnostjo je treba pripraviti osnovne raztopine z ustreznimi koncentracijami (npr. 1 do 5 g/l) v deionizirani vodi ali mineralnem deležu sintetične odpadne vode. Za netopne kemikalije glej Dodatek 5 v poglavju C.10-A. Ta metoda brez sprememb cevnih reaktorjev ni primerna za hlapne kemikalije (odstavek 16). Določiti je treba DOC in TOC osnovne raztopine, meritve pa ponoviti za vsako novo šaržo. Če je razlika med DOC in TOC večja od 20 %, je treba preveriti vodotopnost preskusne kemikalije. DOC ali koncentracijo preskusne kemikalije, izmerjeno s specifično analizo osnovne raztopine, je treba primerjati z nazivno vrednostjo, da se ugotovi, ali

▼M4

je izkoristek dovolj dober (običajno je mogoče pričakovati > 90-odstotnega). Zlasti za disperzije je treba ugotoviti, ali je mogoče DOC uporabiti kot analitski parameter ali ne oziroma ali je mogoče uporabiti samo analitsko tehniko, specifično za preskusno kemikalijo. Za disperzije je potrebno centrifugiranje vzorcev. Pri vsaki novi šarži je treba s specifično analizo izmeriti DOC, KPK ali koncentracijo preskusne kemikalije.

27. Določiti je treba pH osnovne raztopine. Skrajne vrednosti kažejo, da dodatek kemikalije lahko vpliva na pH aktivnega blata v preskusnem sistemu. V takem primeru je treba osnovno raztopino nevtralizirati z majhnimi količinami anorganske kisline ali baze, da se doseže vrednost pH 7 ± 0,5, vendar pa je treba preprečiti obarjanje preskusne kemikalije.

POSTOPEK

Priprava organskega medija za odmerjanje

28. Zagotoviti je treba, da so vsi vsebniki pritoka in iztoka ter cevi, ki vodijo iz posod za pritok in vanje, povsem čisti, da se prepreči rast mikrobov na začetku in med celotnim preskusom.

29. Vsak dan je treba pripraviti svežo sintetično odpadno vodo (odstavek 23), bodisi iz trdnih snovi bodisi iz koncentrirane osnovne raztopine z ustreznim redčenjem z vodovodno vodo. Potrebno količino je treba izmeriti v valju in dodati v čisto posodo za pritok. Po potrebi se sintetični odpadni vodi pred razredčenjem doda tudi potrebna količina osnovne raztopine preskusne kemikalije ali referenčne kemikalije. Če je bolj pripravno ali potrebno, da se prepreči izguba preskusne kemikalije, se pripravi ločena razredčena raztopina preskusne kemikalije v ločenem zbiralniku in se prek druge dozirne črpalke vnese v nagnjene cevi.

30. Alternativno (in prednostno) se uporabi usedena gospodinjska odpadna voda (odstavek 24), po možnosti sveža, zbrana vsak dan.

Delovanje rotirajočih cevnih reaktorjev

31. Za oceno ene preskusne kemikalije sta potrebna dva enaka cevna reaktorja, ki se namestita v prostoru s konstantno temperaturo, ki običajno znaša 22 ± 2 °C.

32. Peristaltične črpalke je treba nastaviti tako, da dovajajo 250 ± 25 ml/h organskega medija (brez preskusne kemikalije) v nagnjene cevi, ki se vrtijo pri 18 ± 2 vrtljajih na minuto. Cevi črpalke je treba na začetku preskusa in med samim preskusom namazati (odstavek 25), da se podaljša njihova življenjska doba in zagotovi pravilno delovanje.

33. Kot naklona cevi glede na vodoravno površino je treba nastaviti tako, da se zagotovi zadrževalni čas vtoka v čisti cevi 125 ± 12,5 s. Zadrževalni čas se oceni tako, da se v vtok doda nebiološki marker (npr. NaCl, inertno barvilo): čas, potreben za doseganje najvišje koncentracije v iztoku, se šteje za srednji zadrževalni čas (ko je film največji, se lahko zadrževalni čas poveča do približno 30 min).

34. Za te pretoke, hitrosti in čase je bilo ugotovljeno, da zagotavljajo ustrezno odstranitev (> 80-odstotno) DOC (ali KPK) in proizvajajo nitrificirane iztoke. Hitrost pretoka je treba spremeniti, če odstranitev ni zadostna ali če je treba simulirati delovanje določene čistilne naprave. V tem primeru je treba hitrost odmerjanja organskega medija prilagajati, dokler se delovanje reaktorja ne ujema z delovanjem čistilne naprave.

▼M4

Inokulacija

35. Kadar se uporabi sintetična odpadna voda, lahko za začetek rasti mikroorganizmov zadostuje inokulacija z izpostavitvijo zraku, sicer je treba vtoku za 3 dni dodati 1 ml/l usedene odpadne vode.

Meritve

36. V rednih presledkih je treba preverjati, ali so stopnje odmerjanja in hitrosti rotiranja v okviru zahtevanih meja. Izmeriti je treba tudi pH iztoka, zlasti če se pričakuje nitrifikacija.

Vzorčenje in analiza

37. Metoda, vzorec in pogostost vzorčenja se izberejo glede na namen preskusa. Na primer, vzamejo se enkratni (ali zajemni) vzorci pritoka in iztoka ali pa se vzorci zbirajo dlje, npr. 3 do 6 ur. V prvem obdobju brez preskusne kemikalije je treba vzorce jemati dvakrat tedensko. Treba jih je filtrirati skozi membrane ali jih približno 15 minut centrifugirati pri približno 40 000 m/s^2 (odstavek 18). Morda jih bo treba pred filtriranjem skozi membrano pustiti, da se usedejo, in/ali jih prefiltirati skozi grobi filter. DOC (ali KPK) je treba določiti vsaj v dveh ponovitvah, po potrebi pa tudi BPK, amonij in nitrit/nitrat.

38. Vse analize je treba izvesti čim prej po zbiranju in pripravi vzorcev. Če je treba analize odložiti, je treba vzorce shraniti v temnem prostoru v polnih in tesno zaprtih steklenicah pri približno 4 °C. Če je treba vzorce shraniti za več kot 48 h, jih je treba globoko zamrzniti, acidificirati ali dodati primerno strupeno kemikalijo (npr. 20 ml/l raztopine 10 g/l živosrebrovega (II) klorida). Zagotoviti je treba, da tehnika shranjevanja ne vpliva na rezultate analize.

Pripravljalno obdobje

39. V tem obdobju biofilm na površini raste, da doseže optimalno debelino. To obdobje običajno traja približno 2 tedna, vendar ne sme preseči 6 tednov. Odstranitev (odstavek 44) DOC (ali KPK) se poveča in doseže vrednost konstantne ravni. Ko je v obeh ceveh dosežena podobna vrednost konstantne ravni, se za preostanek preskusa ena cev izbere za kontrolno. V tem času mora njuno delovanje ostati skladno.

Vnos preskusne kemikalije

40. Na tej stopnji se v drugi reaktor doda preskusna kemikalija pri potrebni koncentraciji, ki je običajno 10–20 mg C/l. V kontrolno enoto se še naprej dovaja samo organski medij.

Obdobje aklimatizacije

41. Še naprej je treba dvakrat na teden izvajati analize za določitev DOC (ali KPK), in če je treba oceniti primarno biološko razgradljivost, s specifično analizo izmeriti tudi koncentracijo preskusne kemikalije. Za aklimatizacijo je potrebnih od 1 do 6 tednov (ali več v posebnih pogojih) po prvem vnosu preskusne kemikalije. Ko delež odstranitve (odstavki 43 do 45) doseže najvišjo vrednost, je treba dobiti 12 do 15 veljavnih vrednosti v fazi konstantne ravni v približno 3 tednih, da se oceni srednji delež odstranitve. Preskus se šteje za končan, če je dosežena dovolj visoka stopnja odstranitve. Običajno preskus ne sme trajati več kot 12 tednov po tem, ko je bila prvič dodana preskusna kemikalija.

▼M4

Luščenje filma

42. Nenadno odstranjevanje velikih količin presežnega filma iz cevi ali luščenje poteka v razmeroma rednih presledkih. Za zagotovitev, da to ne vpliva na primerljivost rezultatov, je treba omogočiti, da preskusi zajemajo vsaj dva polna cikla rasti in luščenja.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

43. Za vsako časovno določeno oceno se izračuna delež odstranitve DOC (ali KPK) preskusne kemikalije, za kar se uporabi enačba:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

pri čemer je:

D_t = delež odstranitve DOC (ali KPK) pri času t,

Cs = koncentracija DOC (ali KPK) v pritoku zaradi preskusne kemikalije, po možnosti ocenjena na podlagi koncentracije v osnovni raztopini in dodane količine (mg/l),

E = izmerjena vrednost DOC (ali KPK) v preskusnem iztoku v času t (mg/l),

Eo = izmerjena vrednost DOC (ali KPK) v kontrolnem iztoku v času t (mg/l).

Izračun se ponovi za referenčno kemikalijo, če se preskuša.

Delovanje kontrolnega reaktorja

44. Delež odstranitve DOC (ali KPK) (D_B) organskega medija v kontrolnem reaktorju je koristna informacija pri oceni biorazgradne dejavnosti biofilma med preskusom. Delež odstranitve se izračuna z enačbo:

$$D_B = 100(1 - E_o/C_m)\%$$

pri čemer je:

Cm = DOC (ali KPK) organskega medija v kontrolnem pritoku (mg/l).

45. Pri vsaki časovno določeni oceni se izračuna odstranitev (D_{ST}) preskusne kemikalije, če je bila izmerjena s specifično analitsko metodo, za kar se uporabi enačba:

$$DST = 100(1 - Se/Si)\%$$

pri čemer je:

Si = izmerjena ali raje ocenjena koncentracija preskusne kemikalije v preskusnem pritoku (mg/l),

Se = izmerjena koncentracija preskusne kemikalije v preskusnem iztoku v času t (mg/l).

▼M4

Če je z analitsko metodo dobljena pozitivna vrednost v nespremenjeni odpadni vodi enaka S_c mg/l, se delež odstranitve (D_{SC}) izračuna z enačbo:

$$DSC = 100(Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Izražanje rezultatov preskusa

46. Delež odstranitve D_t in D_{ST} (ali D_{SC}), če je na voljo, se prikaže grafično v odvisnosti od časa (glej Dodatek 2 k poglavju C.10-A). Vzame se srednji (zaokrožen na najbližje celo število) in standardni odklon 12–15 vrednosti za D_T (in za D_{ST}, če je na voljo), pridobljenih v fazi konstantne ravni kot delež odstranitve preskusne kemikalije. Na podlagi krivulje odstranitve se lahko izpeljejo nekatere ugotovitve o procesu odstranjevanja.

Adsorpcija

47. Če se velika odstranitev DOC preskusne kemikalije opazi na začetku preskusa, se preskusna kemikalija verjetno odstranjuje z adsorpcijo na biofilm. To je mogoče dokazati z določitvijo adsorbirane preskusne kemikalije na trdnih snoveh, odluščenih s filma. Odstranitev DOC kemikalij, ki se adsorbirajo, redko ostane visoka med celotnim preskusom; po navadi je stopnja odstranitve visoka na začetku, nato pa postopoma pade na ravnotežno vrednost. Če pa bi adsorbirana preskusna kemikalija lahko povzročila aklimatizacijo mikrobne populacije, bi se odstranitev DOC preskusne kemikalije povečala in dosegla visoko vrednost konstantne ravni.

Faza prilagajanja

48. Kot pri statičnih presejalnih preskusih je pri številnih preskusnih kemikalijah pred popolno biološko razgradnjo potrebna faza prilagajanja. V njej se kompetentne bakterije aklimatizirajo (ali prilagodijo) skoraj brez odstranitve preskusne kemikalije; nato nastopi začetna rast teh bakterij. Ta faza se konča, za fazo razgradnje pa se poljubno šteje, da se je začela, ko je odstranjenih približno 10 % začetne količine preskusne kemikalije (po dopuščeni adsorpciji, če se zgodi). Faza prilagajanja je pogosto zelo spremenljiva in slabo ponovljiva.

Faza konstantne ravni

49. Faza konstantne ravni krivulje odstranjevanja v kontinuiranem preskusu je opredeljena kot faza, v kateri je razgradnja največja. Trajati mora vsaj 3 tedne in imeti približno 12–15 izmerjenih veljavnih vrednosti.

Srednja stopnja odstranitve preskusne kemikalije

50. Izračuna se srednja vrednost na podlagi vrednosti odstranitve D_t (in D_{st}, če je na voljo) preskusne kemikalije v fazi konstantne ravni. Ta stopnja, ki je zaokrožena na najbližje celo število (1 %), je stopnja odstranitve preskusne kemikalije. Priporoča se tudi, da se izračuna 95-odstotni interval zaupanja za srednjo vrednost. Podobno se izračuna tudi srednja stopnja (D_B) odstranitve organskega medija v kontrolni posodi.

▼M4

Znak biološke razgradnje

51. Če se preskusna kemikalija ne adsorbira znatno na biofilm in ima krivulja odstranitve značilno obliko krivulje biološke razgradnje s fazo prilagajanja, fazo razgradnje in fazo konstantne ravni (odstavka 48 in 49), je mogoče izmerjeno odstranitev zanesljivo pripisati biološki razgradnji. Če se veliko preskusne kemikalije odstrani že na začetku, simulacijski preskus ne more razlikovati med biološkim in abiotskim procesom odstranitve. V takih in drugih primerih, v katerih obstaja dvom o biološki razgradnji (npr. pri ločevanju (stripping)), je treba analizirati adsorbirano preskusno kemikalijo na vzorcih filma ali opraviti dodatne statične (presejalne) preskuse biološke razgradljivosti na podlagi parametrov, ki jasno nakazujejo biološke procese. Taki preskusi so metode porabe kisika (poglavje C.4-D, E in F te priloge) (9) ali preskus, pri katerem se meri nastajanje CO_2 (poglavje C.4-C te priloge ali metoda nadprostora) (10); kot inokulum se uporabi predhodno izpostavljeni biofilm iz ustreznega reaktorja.

52. Če sta bili izmerjeni odstranitev DOC in odstranitev specifične kemikalije, velike razlike med odstranjenimi deleži (pri čemer je prva vrednost nižja od druge) kažejo, da so bili v iztokih vmesni organski produkti, ki se morda težje razgradijo; to je treba raziskati.

Veljavnost rezultatov preskusa

53. Preskus je treba šteti za veljaven, če je stopnja odstranitve DOC (ali KPK) (D_B) v kontrolnih enotah po 2 tednih delovanja > 80-odstotna in če ni bilo opaženega nič nenavadnega.

54. Če se je preskušala dobro razgradljiva (referenčna) kemikalija, mora biti stopnja biološke razgradnje > 90-odstotna, razlika med vrednostmi ponovitev pa ne sme biti večja od 5 %. Če ti merili nista izpolnjeni, je treba pregledati poskusne postopke in/ali dobiti gospodinjsko odpadno vodo iz drugega vira.

55. Razlike med vrednostmi biološke razgradnje iz podvojenih enot (če se uporabljajo), v katerih se obdeluje preskusna kemikalija, prav tako ne smejo biti večje od 5 %. Če to merilo ni izpolnjeno, vendar so odstranitve visoke, je treba analizo nadaljevati še 3 tedne. Če je odstranitev nizka, je treba preučiti zaviralne učinke preskusne kemikalije, če niso znani, in preskus ponoviti pri nižji koncentraciji preskusne kemikalije, če je to izvedljivo.

Poročilo o preskusu

56. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— identifikacijski podatki,

— fizikalno stanje, in kjer je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti.

Preskusni pogoji:

— spremembe preskusnega sistema, zlasti če se preskušajo netopne ali hlapne snovi,

— vrsta organskega medija,

— delež in vrsta industrijskih odpadkov v odpadni vodi, če se uporabljata in sta znana,

— metoda inokulacije,

▼M4

— založna raztopina preskusne kemikalije – vsebnost DOC (raztopljenega organskega ogljika) in TOC (celotnega organskega ogljika); kako je pripravljena, če je suspenzija; uporabljene preskusne koncentracije; razlogi za odstopanje od razpona 10–20 mg/l DOC; metoda dodajanja; datum prvega dodajanja; spremembe v koncentraciji,

— srednji hidravlični zadrževalni čas (brez rasti); rotacijska hitrost cevi; približen kot naklona, če je mogoče,

— podrobnosti o luščenju; čas in intenzivnost,

— preskusna temperatura in razpon,

— uporabljene analitske tehnike.

Rezultati preskusa:

— vsi izmerjeni podatki DOC, KPK, specifične analize, pH, temperatura, dušikove snovi, če je ustrezno,

— vsi izračunani podatki D_t (ali D_{tc}), D_B, D_{St} v tabelarni obliki in krivuljah odstranitve,

— informacije o fazi prilagajanja in fazi konstantne ravni, trajanju preskusa, stopnji odstranitve preskusne kemikalije, referenčne kemikalije (če se preskuša) in organskega medija (v kontrolni enoti), statistični podatki ter izjave o biološki razgradljivosti in veljavnosti preskusa,

— obravnava rezultatov.

VIRI:

(1) Gerike, P., Fischer, W., Holtmann, W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753–758.

(2) Truesdale, G. A., Jones, K., Vandyke, K. G. (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

(3) Baumann, U., Kuhn, G., in Benz, M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

(4) Gloyna, E. F., Comstock, R. F., Renn, C. E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355–1357.

(5) Kumke, G. W., Renn, C. E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

(6) Tomlinson, T. G., Snaddon, D. H. M. (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int. J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Poglavje C.4 te priloge, Določanje „dobre" biorazgradljivosti.

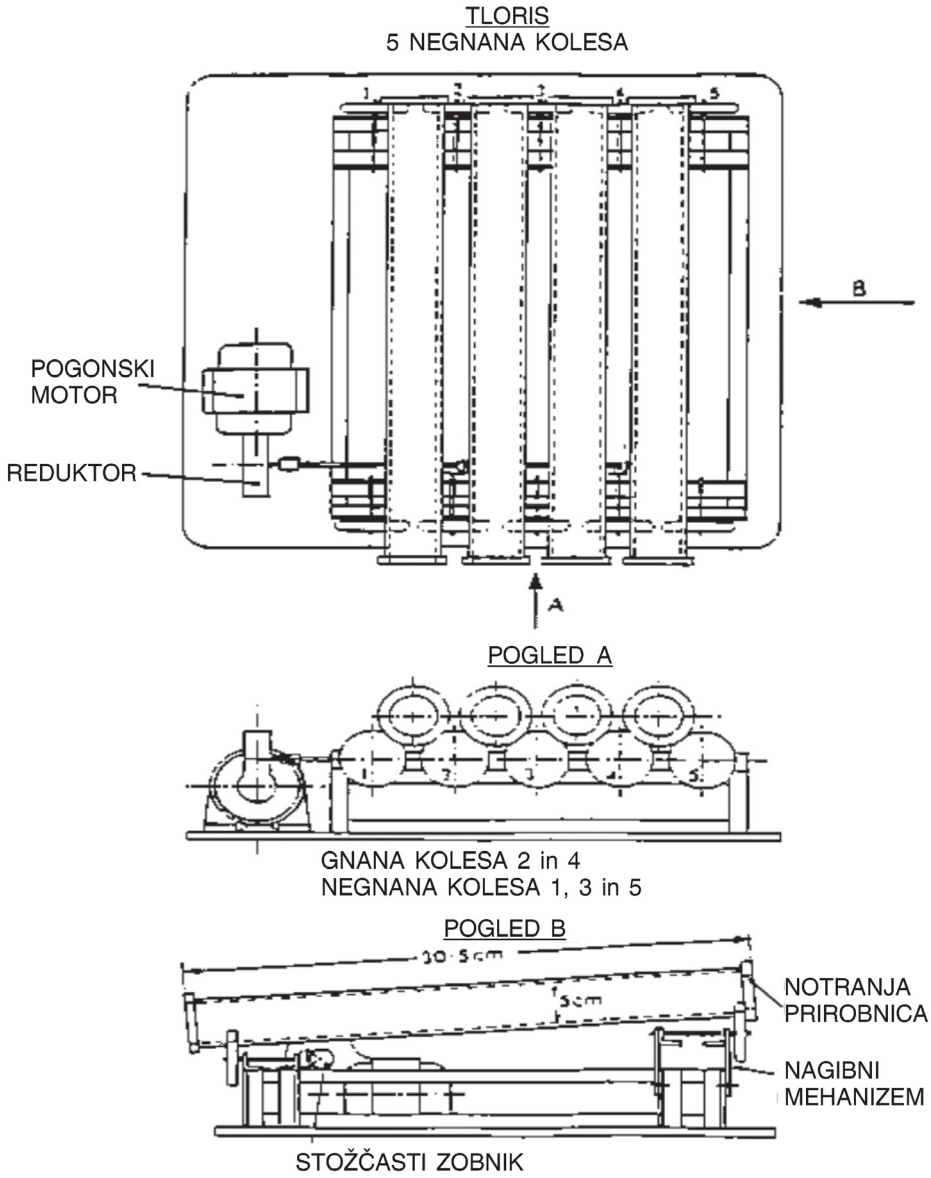
(10) ISO 14593 (1998). Kakovost vode – Vrednotenje končne biorazgradljivosti organskih snovi v vodi. Metoda z analizo sproščenega anorganskega ogljika v zaprtih posodah.

▼**M4**

Dodatek 8

Slika 1

Rotirajoče cevi



Glosar:

Tloris

Pogled A/B

Gnana kolesa

Negnana kolesa

Pogonski motor

Reduktor

Notranja prirobnica

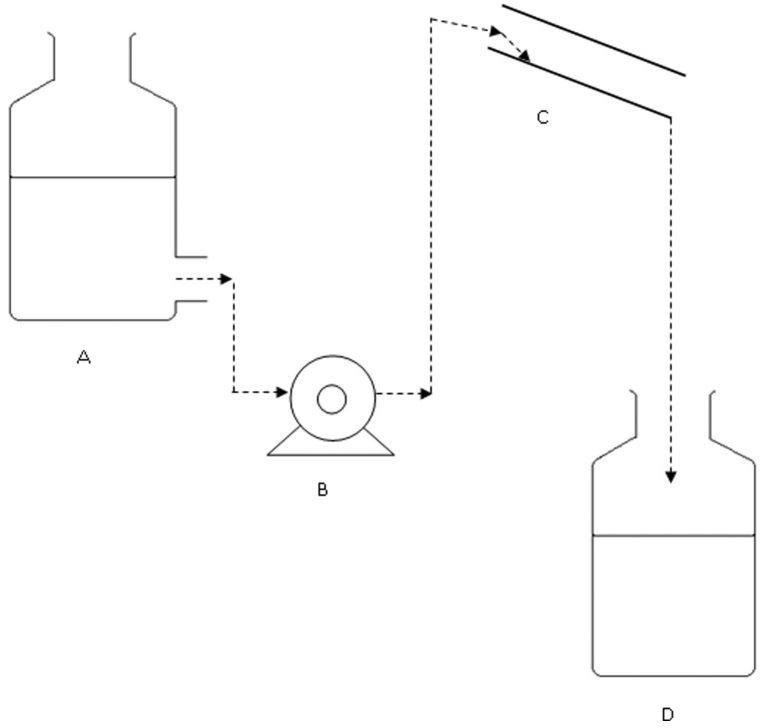
Nagibni mehanizem

Stožčasti zobnik

▼**M4**

Slika 2

Diagram pretoka



A: Rezervoar

B: Peristaltična črpalka

C: Rotirajoča cev

D: Zbiralnik iztoka

OPREDELITEV POJMOV

Preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

Kemikalije: „Opozoriti je treba, da se izraz ‚kemikalija‘ v sporazumih UNCED in nadaljnjih dokumentih uporablja v širokem pomenu ter vključuje snovi, proizvode, zmesi, pripravke ali vse druge izraze, ki se lahko v obstoječih sistemih uporabijo za označevanje vključenosti.“

▼M6

C.11 AKTIVNO BLATO, PRESKUS ZAVIRANJA DIHANJA (OKSIDACIJA OGLJIKA IN AMONIJA)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 209 (2010). Opisana preskusna metoda ocenjuje učinek kemikalije na mikroorganizme iz aktivnega blata (večinoma bakterije) z merjenjem hitrosti dihanja (oksidacije ogljika in/ali amonija) v določenih pogojih pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije. Ta metoda temelji na preskusu ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry – Združenja za ekologijo in toksikologijo industrije proizvodnje barvil) (1)(2), na prejšnji smernici OECD TG 209 (3) in na revidiranem standardu ISO 8192 (4). Namen tega preskusa je omogočiti hitro presejalno metodo, s katero je mogoče oceniti vplive kemikalij na mikroorganizme aktivnega blata v biološki (aerobni) fazi čistilnih naprav za odpadne vode. Rezultati tega preskusa lahko služijo tudi kot kazalnik ustreznih koncentracij preskusnih kemikalij, ki niso zaviralne, za uporabo v preskusih biološke razgradljivosti (na primer poglavja C.4 A–F, C.9, C.10, C.12 in C.29 te priloge, OECD TG 302C). V tem primeru se preskus lahko izvede kot presejalni, podobno kot preskus za določanje območja delovanja ali mejni preskus (glej odstavek 39), pri čemer se upošteva samo celotno dihanje. Vendar je treba te informacije pri preskusih lahke biološke razgradljivosti (poglavji C.4 A–F in C.29 te priloge), za katere je koncentracija inokuluma znatno nižja od koncentracije, uporabljene pri tej preskusni metodi, vzeti z rezervo. Vsekakor odsotnost zaviranja pri tem preskusu dihanja ne pomeni samodejno, da bodo pogoji pri preskusu lahke biološke razgradljivosti iz poglavja C.4 A–F ali C.29 te priloge nezaviralni.

2. V splošnem se zdi, da je bil preskus zaviranja dihanja, odkar je bil prvič objavljen, uspešno uporabljen, v nekaterih primerih pa je bilo poročano o lažnih rezultatih (2)(4)(5). Od koncentracije odvisne krivulje dihanja so včasih dvofazne, krivulje odmerek-odziv se popačijo in vrednosti EC_{50} so nepričakovano nizke (5). Preiskave so pokazale, da do takih rezultatov pride, če aktivno blato v preskusih znatno nitrira in če ima preskusna kemikalija na oksidacijo amonija večji vpliv kot na splošno heterotrofno oksidacijo. Te lažne rezultate je zato mogoče preseči z dodatnim preskušanjem, pri katerem se uporabi ustrezen zaviralec nitrifikacije. Z merjenjem hitrosti privzema kisika v prisotnosti in odsotnosti takšnega zaviralca, npr. n-aliltiouree (ATU), je mogoče ločeno izračunati skupno, heterotrofno in nitrifikacijsko hitrost privzema kisika (4)(7)(8). Tako je mogoče določiti zaviralne učinke preskusne kemikalije na dveh procesih in na običajen način izračunati vrednosti EC_{50} za oksidacijo organskega ogljika (heterotrofno) in oksidacijo amonija (nitrifikacijo). Opozoriti je treba, da je v nekaterih redkih primerih zaviralni učinek n-aliltiouree delno ali popolnoma izničen zaradi kompleksacije s preskusnimi kemikalijami ali dodatki gojišču, npr. z ioni Cu^{++} (6). Ioni Cu^{++} so bistveni za bakterije vrste *Nitrosomonas*, vendar so v višjih koncentracijah strupeni.

3. Potreba po nitrifikaciji pri aerobnem čiščenju odpadnih voda kot nujni korak pri odstranjevanju dušikovih spojin iz odpadnih voda z denitrifikacijo plinastih produktov je postala nuja, še posebej v evropskih državah; Evropska unija je zdaj za koncentracijo dušika v prečiščenih iztokih, odvajanih v sprejemne vode, določila nižje meje ([1]).

([1]) Direktiva Sveta 91/271/EGS z dne 21. maja 1991 o čiščenju komunalne odpadne vode (UL L 135, 30.5.1991, str. 40).

▼M6

4. Za večino namenov zadošča že samo metoda ocenjevanja vpliva na procese oksidacije organskega ogljika. Vendar pa je v nekaterih primerih za razlago rezultatov in razumevanje vplivov potrebna preiskava vpliva samo na nitrifikacijo ali pa na oboje, nitrifikacijo in oksidacijo organskega ogljika, pri čemer se to izvede ločeno.

NAČELO PRESKUSNE METODE

5. Hitrost dihanja vzorcev aktivnega blata, hranjenega s hranili iz sintetičnih odplak, se meri po treh urah stika v zaprti celici, ki vsebuje kisikovo elektrodo. Ob upoštevanju realističnega scenarija izpostavljenosti so lahko primerni daljši časi stika. Če se preskusna kemikalija hitro razkraja, npr. abiotsko s hidrolizo, ali če je hlapna in koncentracije ni mogoče zadovoljivo vzdrževati, je čas izpostavljenosti lahko krajši, npr. 30 minut. Občutljivost vsake šarže aktivnega blata je treba na dan izpostavljenosti preveriti s primerno referenčno kemikalijo. Preskus se običajno uporablja za določanje EC_x (npr. EC_{50}) preskusne kemikalije in/ali koncentracije brez opaznega učinka (NOEC).

6. Zaviranje privzema kisika z mikroorganizmi, ki oksidirajo organski ogljik, je mogoče izraziti ločeno od tistega z mikroorganizmi, ki oksidirajo amonij, in sicer z merjenjem hitrosti privzema kisika v prisotnosti in odsotnosti n-aliltiouree, posebnega zaviralca oksidacije amonija v nitrit, ki na prvi stopnji poteka z nitrifikacijskimi bakterijami. V tem primeru se odstotek zaviranja hitrosti privzema kisika izračuna s primerjavo hitrosti privzema kisika v prisotnosti preskusne kemikalije s srednjo vrednostjo hitrosti privzema kisika ustreznih kontrol, ki ne vsebujejo preskusne kemikalije, v prisotnosti in odsotnosti specifičnega zaviralca, n-aliltiouree.

7. Z določanjem hitrosti v zmeseh preskusne kemikalije, gojišča iz sintetičnih odplak in vode, pri čemer se zanemari aktivno blato, je mogoče zaznati kakršen koli privzem kisika, ki izvira iz abiotskih procesov.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

8. Za pravilno razlago rezultatov morajo biti znani identifikacija (po možnosti številka CAS), poimenovanje (IUPAC), čistost, topnost v vodi, parni tlak, hlapnost in adsorpcijske lastnosti preskusne kemikalije. Hlapnih kemikalij običajno ni mogoče zadovoljivo preskusiti, če niso upoštevani posebni varnostni ukrepi (glej odstavek 21).

UPORABNOST PRESKUSNE METODE

9. Preskusno metodo je mogoče uporabiti pri vodotopnih, slabo topnih in hlapnih kemikalijah. Vendar pa pri kemikalijah z omejeno topnostjo ni vedno mogoče pridobiti vrednosti EC_{50}, veljavne rezultate pri hlapnih kemikalijah pa je mogoče pridobiti le, če večina (recimo > 80 %) preskusne kemikalije ob koncu obdobij izpostavljenosti ostane v reakcijski zmesi. Če obstaja kakršna koli negotovost glede stabilnosti preskusne kemikalije ali njene hlapnosti, je treba za natančnejšo določitev koncentracije EC_x predložiti dodatne analitske podporne podatke.

▼M6

REFERENČNE KEMIKALIJE

10. Za zagotovitev zanesljivosti preskusne metode in preskusnih pogojev ter za preverjanje občutljivosti vsake šarže aktivnega blata, ki se na dan izpostavljenosti uporablja kot mikrobni inokulum, je treba referenčne kemikalije redno preskušati. Kot referenčna zaviralna kemikalija se priporoča 3,5-diklorofenol (3,5-DCP), saj je znan zaviralec dihanja in se uporablja pri mnogih vrstah preskusov zaviranja/strupenosti (4). Kot referenčno kemikalijo pri zaviranju celotnega dihanja (9) je mogoče uporabiti tudi bakrov (II) sulfat pentahidrat. Kot specifični referenčni zaviralec nitrifikacije se lahko uporabi N-metilanilin (4).

MERILA ZA VELJAVNOST IN OBNOVLJIVOST

11. Hitrost privzema kisika slepe kontrole (brez preskusne ali referenčne kemikalije) ne sme biti manjša od 20 mg kisika na gram aktivnega blata (suhe teže suspendiranih trdnih snovi) v eni uri. Če je hitrost nižja, je treba preskus ponoviti s spranim aktivnim blatom ali blatom iz drugega vira. Koeficient variacije hitrosti privzema kisika pri kontrolnih ponovitvah na koncu dokončnega preskusa ne sme biti večji od 30 %.

12. V mednarodnem krožnem preskusu, ki ga je leta 2004 organizirala Mednarodna organizacija za standardizacijo ISO (4) in v kateri je bilo uporabljeno aktivno blato iz gospodinjskih odplak, je bilo ugotovljeno, da se vrednost EC_{50} kemikalije 3,5-DCP pri celotnem dihanju giblje med 2 mg/l in 25 mg/l, pri heterotrofnem dihanju med 5 mg/l in 40 mg/l in pri nitrifikacijskem dihanju med 0,1 mg/l in 10 mg/l. Če vrednost EC_{50} kemikalije 3,5-DCP ni v pričakovanem območju, je treba preskus ponoviti z aktivnim blatom iz drugega vira. Vrednost EC_{50} bakrovega (II) sulfata pentahidrata mora biti za celotno dihanje v območju med 53 mg/l in 155 mg/l (9).

OPIS PRESKUSNE METODE

Preskusne posode in naprave

13. Uporabljena mora biti običajna laboratorijska oprema in naslednje:

(a) preskusne posode – na primer 1 000-ml čaše za 500 ml reakcijske zmesi (glej št. 5 na sliki 1);

(b) celica in dodatki za merjenje koncentracije raztopljenega kisika, primerna kisikova elektroda, zaprta celica brez prostora nad fazno mejo plin-kapljevina, v kateri bo vzorec, in zapisovalnik (npr. št. 7, 8 in 9 na sliki 1 v Dodatku 2); druga možnost je uporaba BPK-steklenice s primerno prilagoditvijo v obliki obojke za zatesnitev kisikove elektrode na vrat steklenice (glej sliko 2 v Dodatku 3). Priporočljivo je, da skozi obojko najprej potisnete pipeto ali stekleno cevko ali pa uporabite posode z navzven razširjenimi robovi; s tem pri vstavljanju kisikove elektrode preprečite izgubo izpodrinjene tekočine. V obeh primerih je treba uporabiti metodo z magnetnim mešalom ali kakšno drugo metodo z mešalom, npr. metodo sonde za samodejno mešanje;

(c) magnetna mešala in magneti, prekriti z inertnim materialom, za uporabo v merilni komori in/ali preskusnih posodah;

(d) naprava za prezračevanje: po potrebi mora stisnjeni zrak preiti skozi ustrezen filter, ki odstrani prah in olje, ter skozi steklenice za pranje, ki vsebujejo vodo za vlaženje zraka. Vsebino posod je treba prezračiti s

▼M6

Pasteurjevimi pipetami ali drugimi napravami za prezračevanje, ki ne adsorbirajo kemikalij. Za zadovoljevanje potrebe po kisiku za blato in premagovanje težav s kemikalijami, ki se preveč penijo, so hlapne in se zato izgubijo ali pa jih je pri prezračevanju z razprševanjem zraka težko razpršiti, je mogoče uporabiti krožni stresalnik, ki deluje pri hitrostih kroženja med 150 in 250 vrtljaji na minuto in katerega stekleničke imajo prostornino na primer 2 000 ml. Preskusni sistem običajno sestavlja več čaš, ki so nenehno prezračevane in nameščene zaporedno (npr. v 10- do 15-minutnih časovnih razmikih), nato pa so zaporedno analizirane. Lahko se uporabljajo tudi validirani instrumenti, ki omogočajo hkratno prezračevanje in merjenje hitrosti porabe kisika v zmeseh;

(e) merilnik vrednosti pH;

(f) centrifuga, splošna namizna centrifuga za blato, ki zmore hitrost 10 000 m/s^2.

Reagenti

14. Vseskozi je treba uporabljati analitsko čiste reagente.

Voda

15. Uporabljati je treba destilirano ali deionizirano vodo, ki vsebuje manj kot 1 mg/l raztopljenega organskega ogljika (DOC), razen če je navedeno, naj se uporablja neklorirana vodovodna voda.

Hranila iz sintetičnih odplak

16. Gojišče mora biti pripravljeno tako, da vsebuje naslednje sestavine v navedenih količinah:

— pepton 16 g,

— mesni ekstrakt (ali primerljiv rastlinski ekstrakt) 11 g,

— sečnino 3 g,

— natrijev klorid (NaCl) 0,7 g,

— kalcijev klorid dihidrat ($CaC1_2$, $2H_2O$) 0,4 g,

— magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4$, $7H_2O$) 0,2 g,

— brezvodni kalijev dihidrogen fosfat (K_2HPO_4) 2,8 g,

— destilirano ali deionizirano vodo do 1 litra.

17. Vrednost pH te raztopine mora biti 7,5 ± 0,5. Če se pripravljeno gojišče ne uporabi takoj, ga je treba najdlje en teden hraniti v temi pri temperaturi od 0 °C do 4 °C ali v pogojih, ki ne povzročajo nikakršnih sprememb v njegovi sestavi. Opozoriti je treba, da so te sintetične odplake 100-kratni koncentrat odplak, opisanih v Tehničnem poročilu OECD z naslovom „Predlagana metoda za določitev biološke razgradljivosti površinsko aktivnih snovi, uporabljenih v sintetičnih detergentih“ z dne 11. junija 1976, tudi z dodatkom dikalijevega hidrogen fosfata.

▼M6

18. Druga možnost je, da se sestavine gojišča pred shranitvijo sterilizirajo posamezno ali pa se tik pred izvajanjem preskusa dodata pepton in mesni ekstrakt. Pred uporabo je treba gojišče dobro premešati, vrednost pH pa po potrebi prilagoditi na 7,5 ± 0,5.

Preskusna kemikalija

19. Založna raztopina mora biti pripravljena za preskusne snovi, ki so brez težav topne v vodi, samo do največje topnosti v vodi (oborine niso sprejemljive). Snovi, ki so slabo topne v vodi, zmesi, katerih sestavine imajo različno topnost v vodi, in adsorptivne snovi je treba odtehtati neposredno v preskusne posode. V teh primerih je druga možnost lahko uporaba založnih raztopin, če so raztopljene koncentracije preskusnih kemikalij analitsko določene v preskusnih posodah (pred dodajanjem aktivnega blata). Če so pripravljeni pripravki Water Accommodated Fraction (WAF), je nujna tudi analitska določitev raztopljenih koncentracij preskusnih kemikalij v preskusnih posodah. Pri uporabi organskih topil se je treba izogibati disperzijskim sredstvom/emulgatorjem. Obdelava založnih raztopin z ultrazvokom in predhodno mešanje suspenzij, npr. čez noč, sta možna, če je na voljo dovolj informacij o stabilnosti preskusne kemikalije v takšnih pogojih.

20. Preskusna kemikalija lahko škodljivo vpliva na vrednost pH v preskusnem sistemu. Vrednost pH zmesi, obdelanih s preskusno kemikalijo, je treba določiti pred pripravo preskusa, v predhodnem preskusu, da se določi, ali je vrednost pH pred glavnim preskusom in še enkrat na dan glavnega preskusa treba prilagoditi. Raztopine/suspenzije preskusne kemikalije v vodi morajo biti pred dodajanjem inokuluma po potrebi nevtralizirane. Ker pa lahko nevtralizacija spremeni kemijske lastnosti kemikalije, se lahko, odvisno od namena študije, izvede dodatno preskušanje, s katerim se oceni učinek preskusne kemikalije na blato brez prilagoditve vrednosti pH.

21. Strupeni učinki hlapnih kemikalij lahko zaradi izgub snovi v obdobju izpostavljenosti povzročijo, da so ravni učinkov različne, še posebej pri preskusih, pri katerih zrak skozi sistem steče v obliki mehurčkov. Pri takšnih snoveh je potrebna previdnost; pri kontrolnih zmeseh, ki vsebujejo snov, je treba izvesti specifično analizo za snov in spremeniti režim prezračevanja.

Referenčna kemikalija

22. Če se kot referenčna kemikalija uporablja 3,5-diklorofenol, je treba pripraviti raztopino 1,00 g 3,5-diklorofenola v 1 000 ml vode (15). Za pospešitev raztapljanja in dopolnitev raztopine do volumna, ko se raztopina ohladi na sobno temperaturo, je treba uporabiti toplo vodo in/ali obdelavo z ultrazvokom. Vendar je treba poskrbeti, da se struktura referenčne kemikalije ne spremeni. Treba je preveriti vrednost pH raztopine in jo po potrebi prilagoditi z NaOH ali H_2SO_4 tako, da vrednost pH znaša 7–8.

23. Če se kot referenčna kemikalija uporablja bakrov (II) sulfat pentahidrat, se uporabijo koncentracije 58 mg/l, 100 mg/l in 180 mg/l (faktor 1,8). Snov se tehta neposredno v preskusnih posodah (29–50–90 mg za celoten volumen 500 ml). Nato se raztopi z 234 ml avtoklavirane vodovodne vode. Bakrov (II) sulfat pentahidrat je zlahka topen. Ob začetku preskusa je dodanih 16 ml sintetičnih odplak in 250 ml aktivnega blata.

▼M6

Specifični zaviralec nitrifikacije

24. Pripraviti je treba založno raztopino 2,32 g n-aliltiouree (ATU) na liter. Z dodajanjem 2,5 ml te založne raztopine zmesi za inkubacijo s končno prostornino 500 ml znaša končna koncentracija 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l); znano je, da to zadošča (4) za 100-odstotno zaviranje nitrifikacije v nitrifikacijskem aktivnem blatu, ki vsebuje 1,5 g/l suspendiranih trdnih snovi.

Abiotska kontrola

25. Pri nekaterih pogojih, ki se sicer redko pojavijo, lahko preskusna kemikalija z močno izraženimi redukcijskimi lastnostmi povzroči merljiv abiotski privzem kisika. V takih primerih so za razlikovanje med abiotsko porabo kisika preskusne kemikalije in mikrobnim dihanjem potrebne abiotske kontrole. Abiotske kontrole je mogoče pripraviti z izpustitvijo inokuluma iz preskusnih zmesi. Podobno je abiotske kontrole brez inokuluma mogoče vključiti pri izvajanju podpornih analitskih meritev za določanje dosežene koncentracije med preskusnim obdobjem izpostavljenosti, npr. pri uporabi založnih raztopin kemikalij, ki so slabo topne v vodi, skupaj s sestavinami, ki imajo drugačno topnost v vodi. V posebnih primerih je morda treba pripraviti abiotsko kontrolo s steriliziranim inokulumom (npr. z avtoklaviranjem ali dodajanjem sterilizirajočih strupenih snovi). Nekatere kemikalije lahko proizvajajo ali porabljajo kisik le, če je površina dovolj velika za reakcijo, tudi če zanjo običajno potrebujejo precej višjo temperaturo ali tlak. V tem pogledu je treba posebno pozornost nameniti snovem s peroksidno vezjo. Sterilizirani inokulum zagotavlja veliko površino.

Inokulum

26. Za splošno uporabo je treba aktivno blato zbrati na izhodu ali v bližini izhoda prezračevalnega bazena dobro delujoče čistilne naprave za odpadne vode, ki v glavnem sprejema gospodinjske odplake. Glede na namen preskusa je mogoče pri primernih koncentracijah suspendiranih trdnih snovi, ki znašajo od 2 g/l do 4 g/l, uporabiti tudi druge primerne vrste virov aktivnega blata, npr. blato, vzgojeno v laboratoriju. Vendar pa bodo vrste blata iz drugih čistilnih naprav najverjetneje imele drugačne lastnosti in občutljivost.

27. Blato je mogoče uporabiti tako, kot je bilo zbrano, vendar je treba odstraniti grobe delce s kratkotrajnim usedanjem, ki traja npr. od 5 do 15 minut, poleg tega pa je treba tudi odliti ali presejati (npr. z mrežo, katere odprtine merijo 1 mm^2) zgornje plasti drobnejših trdih delcev. Druga možnost je homogeniziranje blata v mešalu *pribl*. 15 sekund ali dlje, vendar je pri tem potrebna previdnost v zvezi s strižnimi silami in spremembami temperature, do katerih lahko pride pri daljšem mešanju.

28. Blato je pogosto treba oprati, npr. če je hitrost endogenega dihanja nizka. Blato je treba najprej nekaj časa, npr. 10 minut, centrifugirati pri pribl. 10 000 m/s^2, da nastaneta čist supernatant in pelet trdnih snovi iz odplak. Tekočino supernatanta je treba zavreči, blato pa z mešanjem ponovno suspendirati v neklorirani vodovodni vodi; vodo za pranje je nato s ponovnim centrifugiranjem treba odstraniti in jo ponovno zavreči. Po potrebi je treba postopek pranja in centrifugiranja ponoviti. Določiti je treba suho maso znanega volumna ponovno suspendiranega blata, blato pa je treba koncentrirati z odstranitvijo bistre raztopine nad usedlino ali pa ga dodatno razredčiti v neklorirani vodovodni vodi, tako da bo koncentracija trdnih snovi v blatu dosegla zahtevano vrednost 3 g/l. Aktivno blato je treba pri

▼M6

preskusni temperaturi nenehno prezračevati (npr. s hitrostjo 2 l/minuto) in ga, kadar je le mogoče, uporabiti na dan zbiranja. Če to ni mogoče, je treba blatu dva dodatna dneva vsak dan dovajati hranila iz sintetičnih odplak (50 ml hranila iz sintetičnih odplak/liter aktivnega blata). Blato se nato uporabi za preskus, rezultati pa so sprejeti kot veljavni, če ni prišlo do nobenih pomembnih sprememb v njegovi aktivnosti, ki se ocenijo prek hitrosti endogenega heterotrofnega in nitrifikacijskega dihanja.

29. Če se med inkubacijo pojavi penjenje v takšni meri, da so pena in trdne snovi v blatu, ki jih pena nosi, iztisnjene iz prezračevalnih posod, lahko pride do težav. Občasno se penjenje pojavi samo zato, ker so prisotne sintetične odplake, če pa je preskusna kemikalija površinsko aktivna snov ali če preskusna kemikalija vsebuje površinsko aktivno snov, je penjenje treba pričakovati. Zaradi izgube trdnih snovi v blatu iz preskusnih zmesi pride do umetno znižane hitrosti dihanja, kar se lahko napačno razlaga kot rezultat zaviranja. Poleg tega prezračevanje raztopine površinsko aktivne snovi skoncentrira površinsko aktivno snov v plasti pene; zaradi izgube pene iz preskusnega sistema se bodo koncentracije izpostavljenosti znižale. Penjenje je mogoče nadzorovati s preprostimi mehanskimi metodami (npr. z občasnim ročnim mešanjem s stekleno paličico) ali pa z dodajanjem antipenilca iz silikonske emulzije brez površinsko aktivne snovi in/ali z metodo prezračevanja s stresanjem bučke. Če je težava povezana s prisotnostjo sintetičnih odplak, je treba sestavo odplak spremeniti z dodajanjem antipenilca v razmerju npr. 50 µl/l. Če penjenje povzroča preskusna kemikalija, je treba količino, potrebno za zmanjšanje penjenja, določiti pri maksimalni preskusni koncentraciji, nato pa morajo biti vse posamezne prezračevalne posode enako obdelane (vključno s tistimi, ki npr. vsebujejo slepe kontrole, in referenčnimi posodami, v katerih ni pene). Če se uporabljajo antipenilci, ne sme priti do interakcije z inokulumom in/ali preskusno kemikalijo.

PRESKUSNI POSTOPEK

30. Določiti je mogoče zaviranje pri treh različnih privzemih kisika: pri celotni porabi, samo pri heterotrofni porabi in pri porabi, do katere pride zaradi nitrifikacije. Običajno zadošča merjenje zaviranja celotnega privzema kisika. Treba je poznati učinke na heterotrofni privzem kisika, ki nastanejo zaradi oksidacije organskega ogljika in oksidacije amonija, če za določeno kemikalijo obstaja posebna zahteva za dve takšni ločeni končni točki ali (neobvezno) za razlago atipičnih krivulj „odmerek-odziv“ zaradi zaviranja celotnega privzema kisika.

Preskusni pogoji

31. Preskus je treba izvesti pri temperaturi v območju 20 ± 2 °C.

Preskusne zmesi

32. Za pridobitev različnih nominalnih koncentracij preskusne kemikalije (za primere prostornin sestavin glej preglednico 1) je treba pripraviti preskusne zmesi (F_T, kot je navedeno v preglednici 1), ki vsebujejo vodo, hranila iz sintetičnih odplak in preskusno kemikalijo. Vrednost pH mora biti po potrebi spremenjena na 7,5 ± 0,5; da bodo končne prostornine v posodah enake in da bo mogoče začeti prezračevanje, je treba zmesi razredčiti z vodo in dodati inokulum.

Referenčne zmesi

33. Zmesi (F_R) morajo biti z referenčno kemikalijo, npr. s 3,5-diklorofenolom, ki nadomešča preskusno kemikalijo, pripravljene na enak način kot preskusne zmesi.

▼M6

Slepe kontrole

34. Slepe kontrole (F_B) morajo biti v preskusih, pri katerih so preskusne čaše v časovnih razmikih pripravljene zaporedno, pripravljene na začetku in na koncu obdobja izpostavljenosti. Pri preskusih, izvajanih z opremo, ki omogoča sočasne meritve porabe kisika, je treba v vsako serijo sočasne analize vključiti vsaj dve slepi kontroli. Slepe kontrole vsebujejo enako količino aktivnega blata in sintetičnega gojišča, ne pa preskusne ali referenčne kemikalije. Treba jih je razredčiti z vodo do enake prostornine, kot jo imajo preskusne in referenčne zmesi.

Abiotska kontrola

35. Če je znano ali če se domneva, da ima preskusna kemikalija močno izražene redukcijske lastnosti, je treba za merjenje abiotske porabe kisika po potrebi pripraviti zmes F_A. Zmes mora imeti enake količine preskusne kemikalije in hranil iz sintetičnih odplak ter enako prostornino kot preskusne zmesi, vendar brez aktivnega blata.

Splošni postopek in meritve

36. Preskusne zmesi, referenčne zmesi ter slepe in abiotske kontrole se inkubirajo pri preskusni temperaturi v pogojih prisiljenega prezračevanja (od 0,5 do 1 l/min), da se koncentracija raztopljenega kisika ohranja nad 60–70-odstotno nasičenostjo in da kosmi blata ostajajo v suspenziji. Za to, da kosmi blata ostajajo v suspenziji, je treba kulture tudi mešati. Velja, da se inkubacija začne z začetnim stikom inokuluma aktivnega blata z drugimi sestavinami končne zmesi. Ob koncu inkubacije, po določenem času izpostavljenosti, ki navadno znaša 3 ure, se odvzamejo vzorci za merjenje hitrosti upadanja koncentracije raztopljenega kisika v celici, zasnovani za ta namen (slika 2 v Dodatku 3), ali v do konca napolnjeni BPK-steklenici. Način, na katerega se inkubacije začnejo, je odvisen tudi od zmogljivosti opreme, uporabljene pri merjenju hitrosti porabe kisika. Če jo na primer sestavlja ena sama kisikova sonda, se meritve izvajajo posamezno. V tem primeru morajo biti pripravljene različne zmesi, potrebne za preskus v sintetičnih odplakah, inokulum pa je treba zadržati in v vsako posodo serije je treba dodati zahtevane odmerke blata. Inkubacije se morajo začenjati po vrsti, v ustrezno določenih časovnih razmikih, ki znašajo npr. od 10 do 15 minut. Namesto tega lahko sistem za merjenje sestavlja več sond, ki omogočajo več sočasnih meritev; v tem primeru je mogoče inokulum v ustrezne skupine posod dodati hkrati.

37. Koncentracija aktivnega blata v vseh preskusnih, referenčnih in slepih zmeseh (ne pa v abiotskih kontrolah) nominalno znaša 1,5 g/l suspendiranih trdnih snovi. Porabo kisika je treba izmeriti po 3 urah izpostavljenosti. Izvesti je treba dodatne, 30-minutne meritve izpostavljenosti, kot je ustrezno in opisano zgoraj v odstavku 5.

Možnost nitrifikacije blata

38. Za ugotavljanje, ali blato nitrificira in če da, s kakšno hitrostjo, je treba pripraviti zmesi (F_B) kot v slepi kontroli in dodatne „kontrolne“ zmesi (F_N), ki pa vsebujejo tudi n-aliltioureo v koncentraciji 11,6 mg/l. Zmesi je treba 3

▼M6

ure zračiti in inkubirati pri 20 ± 2 °C. Nato je treba izmeriti hitrosti privzema kisika in izračunati hitrost privzema kisika zaradi nitrifikacije.

Načrti preskusov

Preskus za določanje območja delovanja

39. Predhodni preskus se po potrebi uporablja za ocenjevanje območja koncentracij preskusne kemikalije, potrebne pri dokončnem preskusu za ugotavljanje zaviranja porabe kisika. Druga možnost je, da odsotnost zaviranja porabe kisika preskusne kemikalije v predhodnem preskusu lahko kaže na nepotrebnost dokončnega preskusa, vendar je treba vključiti tri ponovitve pri najvišji preskušani koncentraciji predhodnega preskusa (običajno 1 000 mg/l, odvisno pa je od zahteve po podatkih).

Preglednica 1

Primeri zmesi za predhodni preskus

Reagent	Prvotna koncentracija				
založna raztopina preskusne kemikalije	10 g/l				
založna raztopina sintetičnega gojišča	glej odstavek 16				
založna suspenzija aktivnega blata	3 g/l suspendiranih trdnih snovi				
sestavine zmesi	odmerjanje v preskusne posode ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
založna raztopina preskusne kemikalije (ml) (odstavki od 19 do 21)	0,5	5	50	0	50
založna raztopina hranil iz sintetičnih odplak (ml) (odstavek 16)	16	16	16	16	16
suspenzija aktivnega blata (ml) (odstavki od 26 do 29)	250	250	250	250	0
voda (odstavek 15)	233,5	229	184	234	434
skupna prostornina zmesi (ml)	500	500	500	500	500
koncentracije v zmesi					
preskusna suspenzija (mg/l) aktivno blato	10	10	1 000	0	1 000
(suspendirane trdne snovi) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) Enak postopek mora biti izveden pri referenčni kemikaliji za dodelitev bučkam F_{R1-3}.

40. Preskus je treba izvesti z vsaj tremi koncentracijami preskusne kemikalije, na primer 10 mg/l, 100 mg/l in 1 000 mg/l, s slepo kontrolo in po potrebi z vsaj tremi abiotskimi kontrolami z najvišjimi koncentracijami preskusne kemikalije (kot primer glej preglednico 1). V idealnem primeru najnižja koncentracija ne bi smela imeti nikakršnega učinka na privzem kisika. Izračunati je treba hitrosti porabe kisika in hitrost nitrifikacije, če je to smiselno; nato je treba izračunati odstotek zaviranja. Odvisno od namena preskusa je

▼M6

mogoče tudi samo določiti strupenost mejne koncentracije, npr. 1 000 mg/l. Če pri tej koncentraciji ni nobenega statistično značilnega strupenega učinka, nadaljnje preskušanje pri višjih ali nižjih koncentracijah ni potrebno. Velja pripomniti, da je treba snovi, ki so slabo topne v vodi, zmesi, katerih sestavine imajo različno topnost v vodi, in adsorptivne snovi odtehtati neposredno v preskusne posode. V tem primeru je treba količino, rezervirano za založno raztopino preskusne snovi, nadomestiti z vodo za redčenje.

Dokončni preskus

Zaviranje celotnega privzema kisika

41. Preskus je treba izvesti s serijo koncentracij, izpeljanih iz predhodnega preskusa. Za pridobitev vrednosti NOEC in EC_x (npr. EC_{50}) se v večini primerov priporoča šest kontrolnih koncentracij in pet koncentracij tretiranih vzorcev v geometrijski vrsti s petimi ponovitvami. Abiotske kontrole ni treba ponavljati, če v predhodnem preskusu ni bilo privzema kisika, če pa pride do znatnega privzema, je treba vključiti abiotske kontrole za vsako koncentracijo preskusne kemikalije. Občutljivost blata je treba preveriti z referenčno kemikalijo 3,5-diklorofenol. Občutljivost blata je treba preveriti za vsako preskusno serijo, saj je znano, da se spreminja. V vseh primerih se za merjenje hitrosti privzema kisika v celici s kisikovo elektrodo vzorci iz preskusnih posod odvzamejo po 3 urah in, po potrebi, dodatnih 30 minutah. Iz zbranih podatkov se izračunajo specifične hitrosti dihanja kontrolnih in preskusnih zmesi; odstotek zaviranja se nato izračuna na podlagi spodnje enačbe 7.

Razlikovanje med zaviranjem heterotrofnega dihanja in nitrifikacijo

42. Z uporabo posebnega zaviralca nitrifikacije, ATU, je mogoča neposredna ocena zaviralnih učinkov preskusnih kemikalij na heterotrofno oksidacijo, z odštetjem hitrosti privzema kisika v prisotnosti ATU od celotne hitrosti privzema (brez prisotnosti ATU) pa je mogoče izračunati učinke na hitrost nitrifikacije. Treba je pripraviti dve seriji reakcijskih zmesi v skladu z načrti preskusov za vrednost EC_x ali NOEC, opisano v odstavku 41, dodatno pa mora biti vsaki zmesi ene serije pri končni koncentraciji 11,6 mg/l dodana ATU, ki dokazano popolnoma zavira nitrifikacijo v blatu s koncentracijami suspendiranih trdnih snovi do 3 000 mg/l (4). Po obdobju izpostavljenosti je treba izmeriti hitrosti privzema kisika; te neposredne vrednosti predstavljajo le heterotrofno dihanje, razlika med njimi in ustreznimi hitrostmi celotnega dihanja pa predstavlja nitrifikacijo. Nato se izračunajo različne stopnje zaviranja.

Meritve

43. Po obdobju(-ih) izpostavljenosti je treba vzorec iz prve prezračevalne posode prenesti v celico s kisikovo elektrodo (slika 1 v Dodatku 2) in takoj izmeriti koncentracijo raztopljenega kisika. Če je na voljo sistem z več elektrodami, je mogoče meritve izvesti sočasno. Mešanje (s prekritim magnetom) je nujno pri isti hitrosti kot takrat, ko se elektroda umerja; s tem se zagotovi, da se sonda na spreminjajoče se koncentracije kisika odziva z

▼M6

minimalno zamudo in da so omogočene redne in ponovljive meritve kisika v merilni posodi. Navadno zadošča sistem s samodejno mešalno sondo, ki ga imajo nekatere kisikove elektrode. Med meritvami je treba celico splakniti z vodo. Namesto tega se za polnjenje BPK-steklenice (slika 2 v Dodatku 3), opremljene z magnetnim mešalom, lahko uporabi vzorec. Nato je treba v vrat steklenice vstaviti kisikovo sondo s prilagoditvijo v obliki obojke in zagnati magnetno mešalo. V obeh primerih je treba nenehno meriti koncentracijo raztopljenega kisika in jo določeno obdobje, običajno 5– 10 minut ali dokler koncentracija kisika ne pade pod 2 mg/l, beležiti. Elektrodo je treba odstraniti, zmes vrniti v prezračevalno posodo, če pa so nujne meritve po daljšem obdobju izpostavljenosti, je treba nadaljevati s prezračevanjem in mešanjem.

Preverjanje koncentracije preskusne kemikalije

44. Pri nekaterih namenih je morda nujno merjenje koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah. Če se uporabljajo založne raztopine:

— snovi, ki so slabo topne v vodi,

— zmesi s sestavinami, ki imajo različne topnosti v vodi, ali

— snovi, ki so dobro topne v vodi, pri katerih pa je koncentracija založne raztopine skoraj enaka največji topnosti v vodi,

je treba opozoriti, da raztopljeni del ni znan in da tudi ni znana prava koncentracija preskusne kemikalije, ki je prenesena v preskusne posode. Za opis izpostavljenosti je nujna analitična ocena koncentracij preskusne kemikalije v preskusnih posodah. Zaradi poenostavitve je treba analitično oceno izvesti pred dodajanjem inokuluma. Ker bodo v preskusne posode preneseni le raztopljeni deli, bodo izmerjene koncentracije morda zelo nizke.

45. Da se izognemo časovno potratnim in dragim analizam, je preskusno kemikalijo priporočljivo samo odtehtati neposredno v preskusne posode in se za poznejše izračune zanesti na prvotno tehtano nominalno koncentracijo. Razlikovanje med raztopljenimi, neraztopljenimi in adsorbiranimi deli preskusne kemikalije ni potrebno, ker se vsi ti deli prav tako pojavljajo v resničnih pogojih v čistilni napravi za odpadne vode in se lahko spreminjajo glede na sestavo odplak. Cilj te metode je realistična ocena neinhibitorne koncentracije in ni primerna za podrobno raziskovanje tega, kateri deli prispevajo k zaviranju organizmov v aktivnem blatu. Na koncu je treba neposredno v preskusnih posodah tehtati tudi adsorptivne snovi, posode pa je treba silanizirati, da so izgube, ki nastanejo zaradi adsorpcije, kar najmanjše.

PODATKI IN POROČANJE

Izračun hitrosti privzema kisika

46. Hitrosti privzema kisika je treba izračunati iz srednje vrednosti izmerjenih vrednosti, npr. iz linearnega dela krivulj koncentracije kisika v odvisnosti od časa, s čimer se omeji izračune na koncentracije kisika med 2,0 mg/l in 7,0 mg/l, saj lahko višje in nižje koncentracije vplivajo na hitrosti porabe. Odklonu v razpone koncentracije pod ali nad temi vrednostmi se občasno ni mogoče izogniti in je nujen, na primer, kadar je dihanje močno zadušeno

▼**M6**

in zato zelo počasno ali pa, če določeno aktivno blato diha zelo hitro. To je sprejemljivo, če so podaljšani deli krivulje privzema ravni in se njihovi nakloni ob prehodu meje 2,0 mg/l ali 7,0 mg/l O_2 ne spreminjajo. Vsi ukrivljeni deli krivulje kažejo, da se sistem za merjenje stabilizira ali pa, da se hitrost privzema spreminja in se je ne sme uporabiti pri izračunu hitrosti dihanja. Hitrost privzema kisika mora biti izražena v miligramih na liter na uro (mg/lh) ali v miligramih na gram suhega blata na uro (mg/gh). Hitrost porabe kisika, R, v mg/lh je mogoče izračunati ali interpolirati iz linearnega dela krivulje zabeleženega upada kisika v skladu z enačbo 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

pri čemer je:

Q_1 koncentracija kisika na začetku izbranega dela linearne faze (mg/l),

Q_2 koncentracija kisika na koncu izbranega dela linearne faze (mg/l),

Δ_t časovni razmik med tema dvema meritvama (min.).

47. Specifična hitrost dihanja (R_s) je izražena kot količina kisika, porabljenega na gram suhe teže blata na uro (mg/gh) v skladu z enačbo 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

pri čemer je SS koncentracija suspendiranih trdnih snovi v preskusni zmesi (g/l).

48. Različni kazalniki R, ki jih je mogoče kombinirati, so:

S specifična hitrost,

T hitrost celotnega dihanja,

N hitrost zaradi nitrifikacijskega dihanja,

H hitrost zaradi heterotrofnega dihanja,

A hitrost zaradi abiotskih procesov,

B hitrost, ki temelji na slepih poskusih (srednja vrednost).

Izračun hitrosti privzema kisika zaradi nitrifikacije

49. Razmerje med celotnim dihanjem (R_T), nitrifikacijskim dihanjem (R_N) in heterotrofnim dihanjem (R_H) je podano z enačbo 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

pri čemer je:

R_N hitrost privzema kisika zaradi nitrifikacije (mg/lh),

R_T izmerjena hitrost privzema kisika slepe kontrole (brez ATU; F_B) (mg/lh),

R_T izmerjena hitrost privzema kisika slepe kontrole z dodano ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. To razmerje velja za vrednosti slepih kontrol (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotskih kontrol (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) in preskusov s preskusnimi kemikalijami (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Specifične hitrosti dihanja se izračunajo iz enačb:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Če je vrednost R_N v predhodnem preskusu zanemarljiva (npr. < 5 % R_T v slepih kontrolah), je mogoče predpostaviti, da je heterotrofni privzem kisika enak celotnemu privzemu in da ni prišlo do nitrifikacije. Če bi morali preskusi upoštevati učinke na heterotrofne in nitrifikacijske mikroorganizme, bi bil potreben alternativni vir aktivnega blata. Dokončni preskus se izvede, če so na voljo dokazi o zadušenih hitrostih privzema kisika pri drugih koncentracijah preskusne kemikalije.

Izračun odstotka zaviranja

52. Odstotek zaviranja, I_T, celotne porabe kisika pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije je podan z enačbo 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Podobno je odstotek zaviranja heterotrofnega privzema kisika, I_H, pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije podan z enačbo 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Zaviranje privzema kisika zaradi nitrifikacije, I_N, je pri vsaki koncentraciji podano z enačbo 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Odstotek zaviranja privzema kisika je treba izrisati v odvisnosti od logaritma koncentracije preskusne kemikalije (krivulja zaviranja, glej sliko 3 v Dodatku 4). Krivulje zaviranja se izrišejo za vsako 3-urno obdobje prezračevanja ali dodatno po 30 minutah. Koncentracijo preskusne kemikalije, ki zavira privzem kisika za 50 % (EC_{50}), je treba iz krivulje izračunati ali pridobiti z interpolacijo. Če so na voljo primerni podatki, je mogoče izračunati ali z interpolacijo pridobiti 95-odstotne meje zaupanja vrednosti EC_{50}, naklon krivulje in primerne vrednosti, ki označujejo začetek območja zaviranja (na primer, EC_{10} ali EC_{20}) in konec območja zaviranja (na primer, EC_{80} ali EC_{90}).

56. Treba je opozoriti, da je z vidika variabilnosti, ki jo je mogoče pogosto opaziti pri rezultatih, v mnogih primerih dovolj dodatno izraziti rezultate po velikosti:

EC_{50} < 1 mg/l,

EC_{50} od 1 mg/l do 10 mg/l,

EC_{50} od 10 mg/l do 100 mg/l,

EC_{50} > 100 mg/l.

Razlaga rezultatov

EC_x

▼M6

57. Vrednosti EC_x, vključno z njihovimi pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi 95-odstotnimi mejami zaupanja za parameter, se izračunajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. z analizo probit, logistično ali Weibullovo funkcijo, prilagojeno metodo Spearman-Karber ali enostavno interpolacijo (11)). Vrednost EC_x je pridobljena tako, da je v navedeno enačbo vstavljena vrednost, ki ustreza x % srednje vrednosti kontrole. Za izračun vrednosti EC_{50} ali katere koli druge vrednosti EC_x je treba srednjo vrednost glede na tretirano skupino (x) analizirati z regresijsko analizo.

Ocena vrednosti NOEC

58. Če je statistična analiza namenjena določanju vrednosti NOEC, je potrebna statistika glede na posodo (posamezne posode se štejejo za ponovitve). Uporabljene morajo biti ustrezne statistične metode glede na dokument OECD z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“ (11). V splošnem se s pomočjo enostransko zastavljenega (manj obsežnega) preskušanja domnev pri $p \leq 0{,}05$ proučijo škodljivi učinki preskusne kemikalije v primerjavi s kontrolo.

Poročilo o preskusu

59. Poročilo o preskusu mora vključevati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— splošno ime, kemijsko ime, številka CAS, čistost,

— fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije (npr. log K_{ow}, topnost v vodi, parni tlak, konstanta Henryjevega zakona (H) in morebitne informacije o usodi preskusne kemikalije, npr. adsorpciji, na aktivno blato).

Preskusni sistem:

— vir, pogoji delovanja čistilne naprave za odpadne vode in vtok, ki ga čistilna naprava prejema, koncentracija, predhodno čiščenje in vzdrževanje aktivnega blata.

Preskusni pogoji

— preskusna temperatura, vrednost pH med preskusom in trajanje faz(-e) izpostavljenosti.

Rezultati:

— specifična poraba kisika v kontrolah (mg O_2/(g blata × h),

— vsi izmerjeni podatki, krivulje zaviranja in metoda za izračun EC_{50},

— EC_{50} in, po možnosti, 95-odstotne meje zaupanja, po možnosti EC_{20}, EC_{80}; po možnosti NOEC in uporabljene statistične metode, če ni mogoče določiti vrednosti EC_{50},

— rezultati za zaviranje celotnega in, če je primerno, heterotrofnega in nitrifikacijskega dihanja,

— abiotski privzem kisika v fizikalno-kemijskem kontrolnem vzorcu (če je uporabljen),

— ime referenčne kemikalije in rezultati s to kemikalijo,

— vsa opažanja in vsi odkloni od standardnega postopka, ki bi lahko vplivali na rezultat.

LITERATURA

(1) Brown, D., Hitz, H. R., in Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245–261.

▼M6

(2) King, E. F., in Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27–39.

(3) OECD (1984). Aktivno blato, preskus zaviranja dihanja. Smernica za preskušanje št. 209, Smernice za preskušanje kemikalij, OECD, Pariz.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Kakovost vode – Preskus inhibicije porabe kisika z aktivnim blatom za oksidacijo ogljika in amonija. Mednarodna organizacija za standardizacijo.

(5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WGI/N.183. Mednarodna organizacija za standardizacijo.

(6) Painter, H. A, Jones, K. (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471–483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515–524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig, S., in Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13, št. 12b: 1556–1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Kakovost vode – Navodilo za pripravo in obdelavo v vodi slabo topnih organskih spojin za nadaljnje vrednotenje njihove biorazgradljivosti v vodi. Mednarodna organizacija za standardizacijo.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment, št. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Pariz.

▼**M6**

Dodatek 1

Opredelitve

Pri tej preskusni metodi se uporabljajo naslednje opredelitve:

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

ECx (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki na preskusnih organizmih v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo učinkuje x-odstotno. Vrednost EC_{50} je, na primer, koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da na končno točko preskusa učinkuje 50-odstotno glede na izpostavljeno populacijo v določenem obdobju izpostavljenosti.

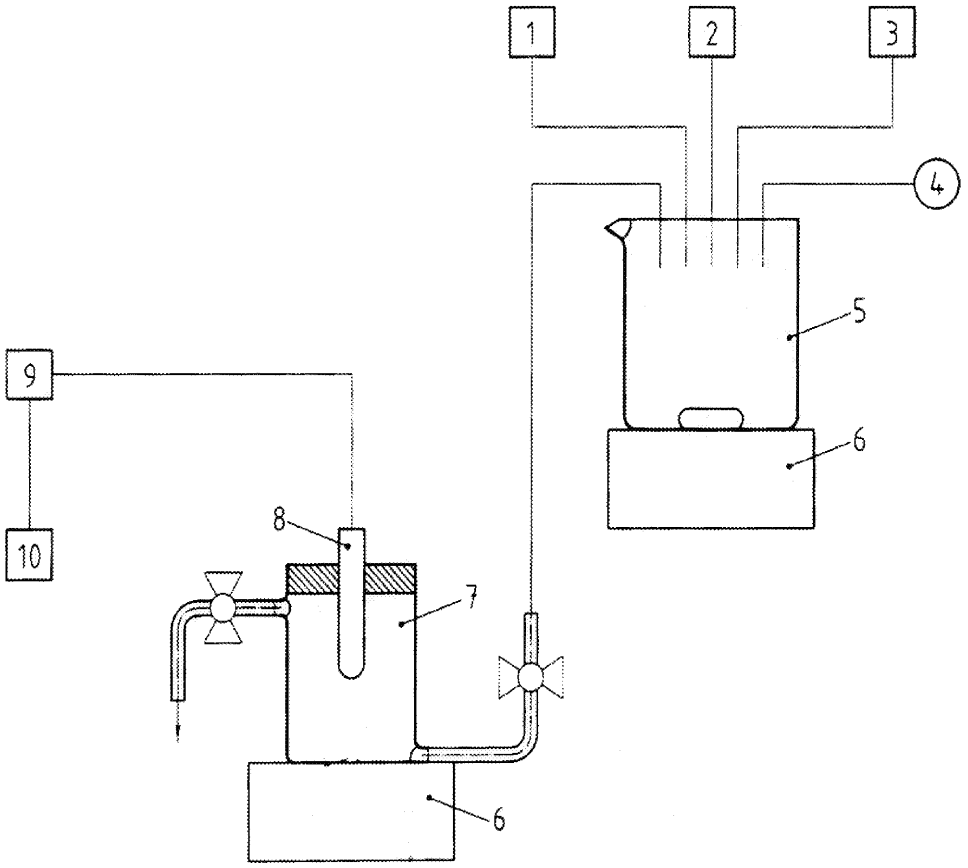
NOEC (koncentracija brez opaznega učinka) je koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri ni opaznega učinka. V tem preskusu koncentracija, ki ustreza vrednosti NOEC, v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$).

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼**M6**

Dodatek 2

Slika 1: **Primeri za merilno enoto**



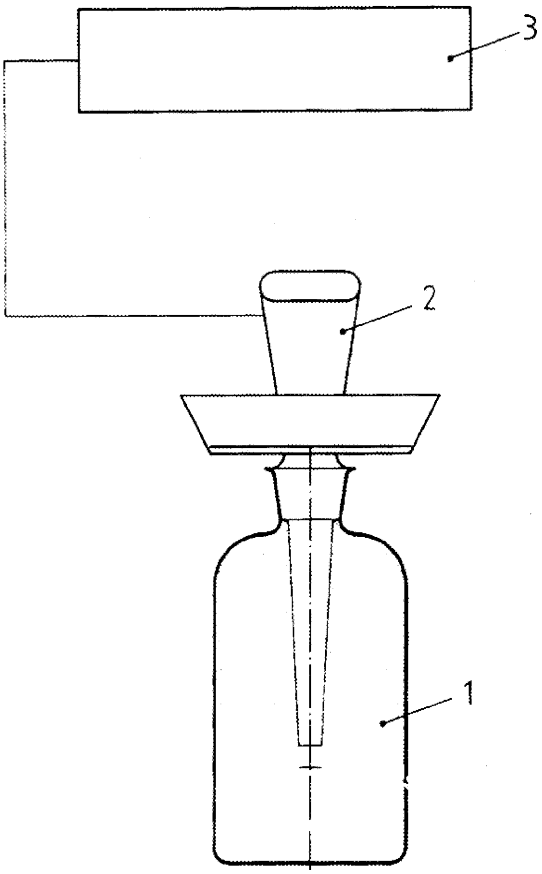
Legenda

1	aktivno blato	6	magnetno mešalo
2	sintetično gojišče	7	celica za merjenje kisika
3	preskusna kemikalija	8	kisikova elektroda
4	zrak	9	instrument za merjenje kisika
5	posoda za mešanje	10	zapisovalnik

▼**M6**

Dodatek 3

Slika 2: **Primeri merilne enote z uporabo BPK-steklenice**



Legenda

1 preskusna posoda

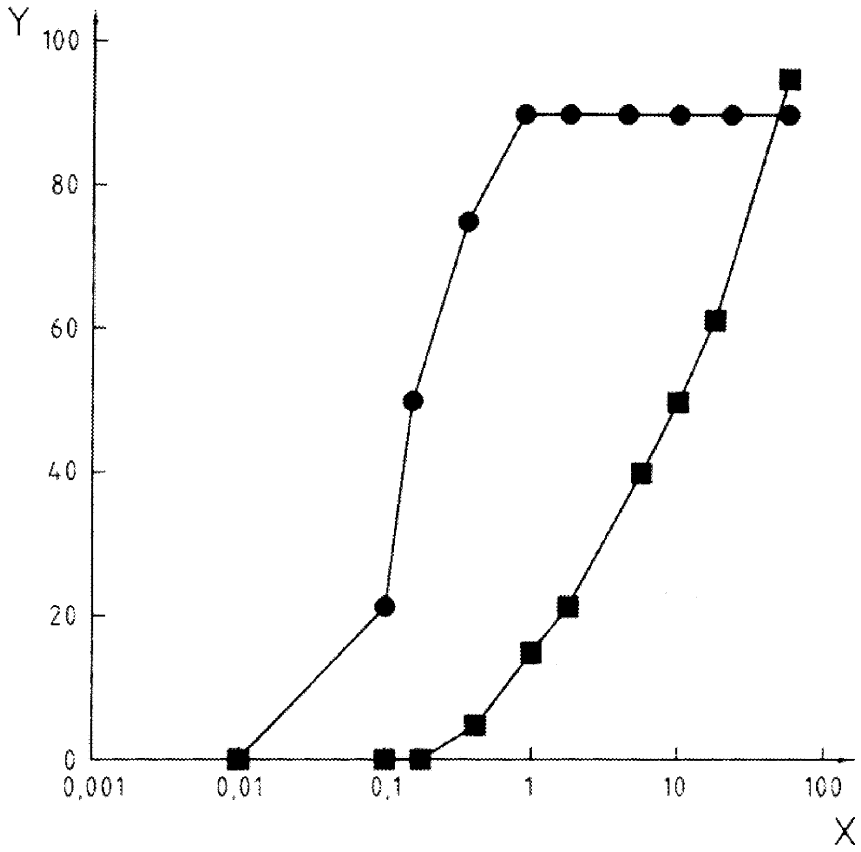
2 kisikova elektroda

3 instrument za merjenje kisika

▼**M6**

Dodatek 4

Slika 3: **Primer krivulj zaviranja**



Legenda

X koncentracija 3,5-diklorofenola (mg/l)

Y zaviranje (%)

■ zaviranje heterotrofnega dihanja z nitrifikacijskim blatom

● zaviranje nitrifikacije z nitrifikacijskim blatom.

▼B

C.12 **BIORAZGRADNJA**

SPREMENJENI SCAS PRESKUS

1. **METODA**

1.1 UVOD

Namen te metode je ocena potencialne skrajne biorazgradljivosti vodotopnih, nehlapnih organskih snovi, ki so za daljši čas izpostavljene relativno visokim koncentracijam mikroorganizmov. Sposobnost preživetja mikroorganizmov se v tem obdobju ohranja z dnevnim dodajanjem hranil iz posedenih odplak. (Med vikendi je treba odplake shraniti na 4 °C. Lahko pa se uporabi sintetične odplake potrditvenega preskusa OECD.)

Lahko pride do fizikalno-kemijske adsorpcije na suspediranih trdnih snoveh, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov (glej 3.2).

Zaradi dolgega obdobja zadrževanja tekoče faze (36 ur) in vmesnega dodajanja hranil, preskus ne simulira pogojev, ki so prisotni v čistilnih napravah. Pridobljeni rezultati z različnimi preskusnimi snovmi kažejo, da ima preskus visok potencial biorazgradnje.

Preskusni pogoji, so zelo ugodni za izbor in/ali prilagoditev mikroorganizmov, ki lahko razgradijo preskusno spojino. (Ta postopek je mogoče uporabiti tudi za pridobitev aklimatiziranih inokulumov za uporabo v drugih preskusih.)

Pri tej metodi se merilo koncentracije raztopljenega organskega ogljika uporablja za oceno skrajne biorazgradljivosti preskusnih snovi. Zaželena je določitev DOC po zakisanju in čiščenju, in ne kot razliko med $C_{skupni} - C_{anorganski}$.

Istočasna uporaba specifične analitske metode lahko omogoči oceno primarne razgradnje snovi (izginotje matične kemijske strukture).

Metoda se uporablja le za tiste organske preskusne snovi, ki so pri koncentracijah, uporabljenih v preskusu:

— topne v vodi (najmanj 20 mg raztopljenega organskega ogljika/liter),

— imajo zanemarljiv parni tlak,

— ne zaviraj o bakterij,

— se bistveno ne adsorbirajo v preskusnem sistemu,

— se ne izgubijo iz preskusne raztopine s penjenjem.

Določiti je treba vsebnost organskega ogljika v preskusnem materialu.

▼B

Podatki o relativnih deležih glavnih sestavin preskusnega materiala bodo uporabni pri razlagi dobljenih rezultatov, zlasti v primerih, kadar so ti rezultati nizki ali obrobni.

Podatki o strupenosti snovi za mikroorganizme so lahko uporabni pri razlagi nizkih rezultatov in pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij.

1.2 OPREDELITEV POJMOV IN ENOTE

C_T = koncentracija preskusne spojine v obliki organskega ogljika, kot je prisotna ali dodana usedenim odplakam na začetku obdobja prezračevanja (mg/liter),

C_t = koncentracija raztopljenega organskega ogljika, ugotovljenega v supernatantu v preskusni tekočini na koncu obdobja prezračevanja (mg/liter),

C_c = koncentracija raztopljenega organskega ogljika, odkritega v supernatantu kontrole na koncu obdobja prezračevanja (mg/liter).

Biorazgradnja je v tej metodi opredeljena kot izginotje organskega ogljika. Biorazgradnja se lahko prikaže z:

1. Odstotkom odstranitve D_{da} količine dnevno dodane snovi:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

pri čemer je

D_{da} = razgradnja/dnevno dodajanje.

2. Odstotek odstranitve D_{ssd} količine snovi, prisotne na začetku vsakega dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

pri čemer je

D_{ssd} = razgradnja/snov na začetku dneva,

indeksa i in (i + 1) veljata za dan meritve.

Enačba 2(a) je priporočljiva, če se DOC iztoka razlikuje iz dneva v dan, medtem ko se enačbo 2(b) lahko uporabi, kadar iztok DOC ostaja iz dneva v dan relativno konstanten.

▼B

1.3 REFERENČNE SNOVI

V nekaterih primerih, kadar se preiskuje nova snov, so referenčne snovi lahko uporabne; vendar pa specifične referenčne snovi tukaj niso priporočene.

Zagotovljeni so podatki o nekaj spojinah, ocenjenih s krožnimi testi (glej Dodatek 1), predvsem zaradi tega, da se lahko od časa do časa izvede umerjanje metode in da se omogoči primerjava rezultatov pri uporabi kakšne druge metode.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Aktivno blato iz čistilne naprave se prenese v polkontinuirano enoto aktivnega blata („semi-continuous activated sludge“ – SCAS). Doda se preskusna spojina in usedene gospodinjske odplake, mešanica pa se nato prezračuje 23 ur. Nato se prezračevanje ustavi, blato se pusti, da se usede, supernatanta se odstrani.

Blato, ki ostane v prezračevalnih komorah, se potem premeša z dodatnim alikvotom preskusne spojine in odplak in cikel se ponovi.

Biorazgradnja se ugotovi z določitvijo vsebnosti raztopljenega organskega ogljika v supernatantu. Ta vrednost se primerja z vrednostjo, dobljeno v supernatantu, dobljenem iz kontrole, dozirane samo s usedenimi odplakami.

Pri uporabi specifične analitske metode, se lahko izmerijo spremembe v koncentraciji matične molekule kot posledica biorazgradnje (primarna biorazgradljivost).

1.5 MERILA KAKOVOSTI

Ponovljivost te metode, utemeljena na podlagi odstranitve raztopljenega organskega ogljika, še ni bilo določena. (Kadar naj bi šlo za primarno biorazgradnja, se zelo natančni podatki dobijo iz materialov, ki so znatno razgrajeni.)

Občutljivost metode se na splošno določi s spremenljivostjo negativne kontrole in, v manjši meri, z natančnostjo določitve raztopljenega organskega ogljika in stopnjo preskusne spojine v raztopini na začetku vsakega cikla.

1.6 OPIS PRESKUSNEGA POSTOPKA

1.6.1 *Priprave*

Uporabi se lahko zadostno število čistih prezračevalnih enot ali pa originalna 1,5 litrska preskusna enota SCAS s cevmi za dovod zraka (Slika 1) za vsako preskusno snov in kontrole. Stisnjeni zrak, ki se dovaja v preskusne enote prečiščen skozi bombažni filter, ne sme vsebovati organskega ogljika ali biti predhodno nasičen z vodo, da bi se zmanjšale izgube zaradi izhlapevanja.

Vzorec premešane suspenzije aktivnega blata, ki vsebuje 1 do 4 g suspendiranih trdnih snovi/liter, se dobi iz čistilni napravi z aktivnim blatom, ki pretežno čistijo gospodinjske odplake. Za vsako prezračevalno enoto se zahteva približno 150 ml suspenzije aktivnega blata.

▼B

Osnovne raztopine preskusne snovi se pripravijo v destilirani vodi; običajno zahtevana koncentracija je 400 mg/liter organskega ogljika, s čimer dobimo koncentracijo preskusne spojine v višini 20 mg/liter ogljika na začetku vsakega prezračevalnega cikla, v kolikor ne pride do biorazgradnje.

Višje koncentracije so dovoljene, če to strupenost za mikroorganizmov omogoča.

Izmeri se vsebnost organskega ogljika v osnovnih raztopinah.

1.6.2 *Preskusnu pogoji*

Preskus je treba opraviti pri 20 do 25 °C.

Uporabi se visoka koncentracija aerobnih mikroorganizmov (od 1 do 4 g/liter suspendiranih trdnih snovi), učinkovito obdobje zadrževanja pa traja 36 ur. Karbonatni material v hranilih odplak se močno oksidira, običajno v osmih urah po začetku vsakega prezračevalnega cikla. Potem blato endogeno diha v preostalem obdobju prezračevanja, v katerem je edini razpoložljivi substrat preskusna spojina, razen če tudi ta ni že metabolizirana. Te lastnosti skupaj z vsakodnevno ponovno inokulacijo preskusa, kadar se kot gojišče uporablja gospodinjske odplake, ustvarjajo izredno ugodne pogoje tako za prilagoditev kot tudi visoke stopnje biorazgradnje.

1.6.3 *Izvajanje preskusa*

Vzame se vzorec suspenzije aktivnega blata iz čistilne naprave z aktivnim blatom za gospodinjske odplake ali pa se zame laboratorijske enote in se jih ohranja v aerobnem stanju, dokler se jih ne uporabi v laboratoriju. Vsaka prezračevalna enota, kakor tudi kontrolna enota, se napolni s 150 ml suspenzije aktivnega blata (če se uporablja originalna preskusna enota SCAS, se dana količina pomnoži z 10) in prične se prezračevanje. Po 23 urah se prezračevanje ustavi in blato se pusti, da se 45 minut useda. V tem času se odpre zamašek na vsaki posodi in se odvzame 100 ml supernatanta. Tik pred uporabo se vzame vzorec usedenih gospodinjskih odplak, 100 ml pa se doda blatu, ki ostane v vsaki prezračevalni enoti. Še enkrat se prične prezračevanje. V tej fazi se ne dodajajo nikakršni preskusni materiali, enote pa se vsak dan napolnijo z gospodinjskimi odplakami, dokler se pri usedanju ne dobi čisti supernatant. To ponavadi traja do dva tedna, v tem času pa se raztopljeni organski ogljik v supernatantu na koncu vsakega prezračevalnega cikla približa konstantni vrednosti.

Na koncu tega obdobja se premešajo posamezna usedena blata in v vsako enoto se doda 50 ml dobljenega sestavljenega blata.

Kontrolnim enotam se doda 95 ml usedenih odplak in 5 ml vode, preskusnim enotam pa 95 ml usedenih odplak plus 5 ml ustrezne preskusne spojine osnovne raztopine (400 mg/liter). Ponovno se začne prezračevanje, ki traja 23 ur. Blato se potem pusti, da se 45 minut useda, in odvzame se supernatant, ki se ga analizira za raztopljeni organski ogljik.

Zgoraj opisani postopek dodajanja in odvzemanja se ponavlja dnevno ves čas preskusa.

▼B

Pred usedanjem bo lahko treba očistiti stene enot, da bi se preprečilo kopičenje trdnih snovi nad nivojem tekočine. Za vsako enoto se uporabi drugo strgalo ali krtača, da bi se preprečile navzkrižne okužbe.

Najbolje je, da se raztopljeni organski ogljik v supernatantu določa dnevno, čeprav so dopustne tudi manj pogoste analize. Pred analizo se raztopine prefiltrirajo skozi čiste 0,45 μm membranske filtre ali pa se centrifugirajo. Membranski filtri so ustrezni, če se zagotovi, da ne prepuščajo ogljika niti absorbirajo snovi med filtracijo. Temperatura snovi ne sme presegati 40 ^{o}C, medtem ko je v centrifugi.

Trajanje preskusa v primeru spojin, ki kažejo malo ali sploh nikakršne biorazgradnje, je neomejeno, vendar je na podlagi izkušenj priporočeno, da naj na splošno preskus traja najmanj 12 in ne dlje kot 26 tednov.

2. PODATKI IN OCENA

Vrednosti raztopljenega organskega ogljika v supernatantih preskusnih in kontrolnih enot se prikažejo v odvisnosti od časa.

Ko se doseže biorazgradnja, se bo stopnja, ugotovljena v preskusu, približala stopnji, ugotovljeni v kontroli. Ko se ugotovi, da je razlika med dvema stopnjama po treh zaporednih meritvah konstantna, se določi število nadaljnjih meritev, potrebnih za omogočanje statistične obdelave podatkov, in izračuna se odstotek biorazgradnje preskusne spojine (D_{da} ali D_{ssd}, glej 1.2).

3. POROČANJE

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vse podatke o vrsti odplak, tipu uporabljene enote in rezultatih preskusa v zvezi s preskusno snovjo, referenčna snov, če je uporabljena, in negativna kontrola,

— temperatur,

— krivulja odstranitve z opisom, način izračunavanja (glej 1.2),

— datum in mesto vzorčenja aktivnega blata in odplak, status prilagoditve, koncentracija, itd.,

— znanstveni razlogi za vsako spremembo preskusnega postopka,

— podpis in datum.

▼B

3.2 RAZLAGA REZULTATOV

Ker snov, ki se preskuša s to metodo, še ne bo hitro biorazgradljiva, se bo vsaka odstranitev DOC, ki je izključno posledica biorazgradljivosti, običajno odvijala postopoma nekaj dni ali tednov, razen v tistih primerih, kjer je prilagoditev trenutna, kar se kaže z nenadnim izginotjem, ki se zgodi po nekaj tednih.

Pomembno vlogo pa lahko v nekaterih primerih odigra tudi fizikalno-kemijska adsorpcija; to se pokaže, kadar gre za celotno ali delno odstranitev dodanega DOC na samem začetku. Kaj se zgodi potem, je odvisno od dejavnikov, kot so stopnje adsorpcije in koncentracija suspendiranih trdnih snovi v zavrženem iztoku. Ponavadi razlika med koncentracijo DOC v kontrolnih in preskusnih supernatantih postopoma narašča od začetne nizke vrednosti, ta razlika pa se potem ohranja pri novi vrednosti preostali del preskusa, razen če ne pride do prilagoditve.

Če je treba določiti razliko med biorazgradnjo (ali delno biorazgradnjo) in adsorpcijo, so potrebni dodatni preskusi. To je mogoče opraviti na številne načine, naj prepričljivejša pa je uporaba supernatanta ali blata kot inokuluma v preskusu iz osnovne zbirke (po možnosti v respirometričnem preskusu).

Preskusne snovi, ki v tem preskusu povzročajo visoko, neadsorptivno odstranitev DOC, je treba šteti za potencialno biorazgradljive. Delna, neadsorptivna odstranitev pomeni, da je kemikalija le izpostavljena nekakšni biorazgradnji.

Nizke ali nične odstranitve DOC lahko pomenijo, da preskusna snov zavira mikroorganizme, to pa je mogoče odkriti tudi z lizo in izgubo blata, kar povzroča motne supernatante. Preskus je treba ponoviti z uporabo nižje koncentracije preskusne snovi.

Uporaba specifične analitske metode ali preskusne snovi z oznako ^{14}C lahko omogoči večjo občutljivost. V primeru ^{14}C preskusne spojine bo predelava $^{14}CO_2$ potrdila, da je prišlo do biorazgradnje.

Kadar podani podatki veljajo za primarno biorazgradnjo, je treba, če je mogoče, razložiti spremembo kemijske strukture, ki povzroča izgubo odziva matične preskusne snovi.

Validacija analitske metode mora biti podana skupaj z odzivom, odkritim na preskusnem gojišču negativne kontrole.

4. **VIRI**

(1) OECD, Pariz, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

Dodatek 1

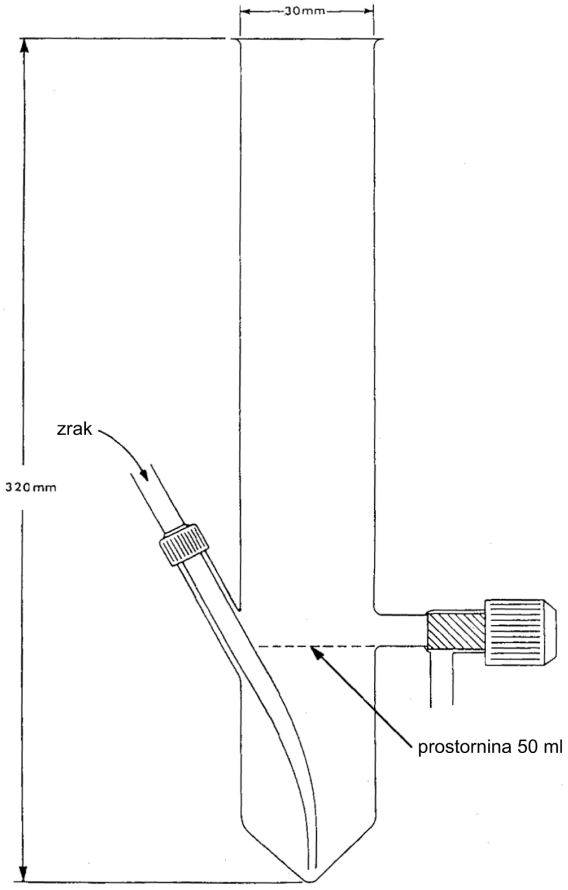
SCAS preskus: primeri rezultatov

Snov	C_t (mg/l)	C_t-C_c (mg/l)	Odstotek biorazgradnje D_{da}	Trajanje preskusa (dni)
4-acetil aminobenzensulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilen benzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilen glikol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentan tetra karboksilat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Dodatek 2

Primer preskusne naprave



▼M7

C.13 **BIOAKUMULACIJA V RIBAH: VODNA IN PREHRANSKA IZPOSTAVLJENOST**

UVOD

Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 305 (2012). Glavni cilj te revizije preskusne metode zajema dva vidika. Kot prvo je njen namen zajeti preskus prehranske bioakumulacije ([1]), ki je primeren za določanje bioakumulacijskega potenciala snovi z zelo nizko topnostjo v vodi. Kot drugo pa je njen namen oblikovati preskusno metodo, ki, kadar je to ustrezno, uporablja manj rib zaradi dobrobiti živali in je bolj stroškovno učinkovita.

V letih po sprejetju enotne preskusne metode C.13 (1) so bile preskušene številne snovi, laboratoriji in regulativni organi pa so pridobili mnoge izkušnje. Na podlagi tega se je oblikovalo prepričanje, da se lahko kompleksnost preskusa zmanjša, če so izpolnjena določena merila (prim. odstavek 88), in da je mogoč stopenjski pristop. Izkušnje tudi kažejo, da lahko biološki dejavniki, kot sta rast in vsebnost lipidov v ribah, močno vplivajo na rezultate in da jih je morda treba upoštevati. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da preskušanje zelo slabo topnih snovi v vodi morda ni tehnično izvedljivo. Za snovi z zelo nizko topnostjo v vodi v vodnem okolju ima morda izpostavljenost prek vode tudi omejen pomen v primerjavi s prehransko izpostavljenostjo. Na podlagi tega se je oblikovala preskusna metoda, pri kateri so ribe izpostavljene prek njihove hrane (prim. odstavki 7–14 in od 97 naprej). Validacija (krožni preskus) preskusa prehranske izpostavljenosti je bila izvedena leta 2010 (51).

Glavne spremembe zajemajo:

— preskušanje samo ene preskusne koncentracije se obravnava kot zadostno, če je biokoncentracijski faktor (BKF) najverjetneje neodvisen od preskusne koncentracije;

— minimiziran načrt preskusa vodne izpostavljenosti, pri katerem je mogoče manjše število vzorčnih točk, če so izpolnjena določena merila;

— vsebnost lipidov v ribah bi bilo treba izmeriti tako, da se lahko BKF izrazi na podlagi 5-odstotne vsebnosti lipidov;

— večji poudarek na oceni kinetičnega BKF (kadar je to mogoče) poleg ocene stacionarnega BKF;

— kadar se preskus prehranske izpostavljenosti obravnava kot ustreznejši od preskusa vodne izpostavljenosti, se predlaga za določene skupine snovi;

— izmeriti je treba težo ribe, zato da se lahko BKF_k popravi glede na razredčitev zaradi rasti.

Pred izvedbo kakršnih koli bioakumulacijskih preskusov morajo biti znane naslednje informacije o preskusni snovi:

(a) občutljivost analitske tehnike za merjenje koncentracij preskusne snovi in morebitnih metabolitov v tkivu, vodi in hrani (prim. odstavek 65);

(b) topnost v vodi [TM A.6; (2)]; topnost v vodi je treba določiti v skladu z metodo, ki je ustrezna za (ocenjeno) območje topnosti, da se pridobi zanesljiva vrednost. Za hidrofobne snovi je to običajno metoda z izpiranjem kolone;

([1]) Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

▼M7

(c) porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda, K_{OW} ([1]) [TM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; ali druge ustrezne informacije o porazdelitvenem vedenju (npr. sorpcija na lipide, K_{OC}); treba jih je določiti v skladu z metodo, ki je ustrezna za (ocenjeno) območje K_{OW}, da se pridobi zanesljiva vrednost. Za hidrofobne snovi je to običajno metoda počasnega mešanja [TM A.23 (6)];

(d) obstojnost snovi v vodi (hidroliza [TM C.7 (7)]);

(e) obstojnost snovi v hrani (zlasti, kadar se izbere pristop s preskusom prehranske izpostavljenosti);

(f) informacije o fototransformaciji, ki so pomembne za pogoje obsevanja pri preskusu (8);

(g) površinska napetost (tj. za snovi, za katere ni mogoče določiti log K_{OW}) [TM A.5 (9)];

(h) parni tlak [TM A.4 (10)];

(i) kakršne koli informacije o biotski ali abiotski razgradnji v vodi, med drugim na primer o lahki biološki razgradljivosti [TM C.4, deli od II do VII (11), C.29 (12)], kadar je to ustrezno;

(j) informacije o metabolitih: struktura, log K_{OW}, nastajanje in razgradljivost, kadar je to ustrezno;

(k) disociacijska konstanta kisline (pK_a) za snovi, ki lahko ionizirajo. Po potrebi je treba prilagoditi pH preskusne vode, da se zagotovi, da je snov v preskusu v neionizirani obliki, če je to združljivo z vrsto rib.

Neodvisno od izbrane metode izpostavljenosti ali sheme vzorčenja ta preskusna metoda opisuje postopek za opredelitev lastnosti bioakumulacijskega potenciala snovi v ribah. Čeprav so najbolj zaželeni režimi pretočnega preskusa, se lahko uporabljajo tudi sistemi polstatičnega preskusa, če so izpolnjena merila za veljavnost (prim. odstavka 24 in 113). Pri načinu prehranske izpostavljenosti za ohranjanje koncentracij preskušane snovi v vodi ni potreben pretočni sistem, vendar slednji pomaga ohraniti ustrezne koncentracije raztopljenega kisika ter zagotoviti čisto vodo in odstraniti različne vplive, npr. produktov izločanja.

Neodvisno od izbrane preskusne metode je za to preskusno metodo zagotovljenih dovolj podrobnosti za izvajanje preskusa, hkrati pa ostaja dovolj svobode pri prilagajanju načrta preskusa pogojem v določenih laboratorijih in različnim lastnostim preskusnih snovi. Preskus vodne izpostavljenosti je najustrezneje uporabiti za obstojne organske snovi z vrednostmi log K_{OW} med 1,5 in 6,0 (13), vendar se lahko še vedno uporabi za močno hidrofobne snovi (z vrednostjo log K_{OW} > 6,0), če je mogoče dokazati obstojno in povsem raztopljeno koncentracijo preskusne snovi v vodi. Če ni mogoče dokazati obstojne koncentracije preskusne snovi v vodi, študija vodne izpostavljenosti ni primerna, zato je za preskušanje snovi pri ribah treba uporabiti prehranski pristop (čeprav je razlaga in uporaba rezultatov prehranskega preskusa morda odvisna od regulativnega okvira). Predhodne ocene biokoncentracijskega faktorja (BKF, ki je včasih označen z K_B) za organske snovi z vrednostmi log K_{OW} do približno 9,0 je mogoče dobiti z

([1]) Včasih označena s P_{OW}; določena z metodo stresanja bučke v TM A.8 (4), metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) v TM A.24 (5) in metodo počasnega mešanja v TM A.23 (6). Za določanje log K_{OW} se občasno uporablja tehnika generator-kolona. Na voljo je omejeno število študij, ki uporabljajo to tehniko, predvsem za klorirane bifenile in dibenzodioksine (npr. Li in Doucette, 1993) (3). Za snovi, ki lahko ionizirajo, se mora log K_{OW} nanašati na neionizirano obliko.

▼M7

uporabo enačbe iz Bintein idr. (14). Predhodna ocena biokoncentracijskega faktorja za tako močno hidrofobne snovi je morda višja od vrednosti stacionarnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_{SS}), ki se pričakuje v laboratorijskih preskusih, zlasti ko se za predhodno oceno uporabi preprost linearni model. Parametri, ki opredeljujejo bioakumulacijski potencial, zajemajo konstanto hitrosti absorpcije (k_1), konstante hitrosti izgube, vključno s konstanto hitrosti očiščenja (k_2), stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}), kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K) in prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF) ([1]).

Izotopsko označene preskusne snovi lahko pospešijo analizo vodnih, prehranskih in ribjih vzorcev ter se uporabijo pri odločitvi, ali je treba identificirati in količinsko opredeliti metabolite. Pri merjenju skupnih radioaktivnih ostankov (npr. s sežigom ali solubilizacijo tkiva) temeljita BKF in BMF na skupni vrednosti matične snovi, morebitnih ohranjenih metabolitov in tudi asimiliranega ogljika. Vrednosti BKF in BMF, ki temeljijo na skupnih radioaktivnih ostankih, torej morda niso neposredno primerljive z vrednostmi BKF in BMF, ki so izpeljane z določeno kemijsko analizo zgolj matične snovi. Pred analizo v študijah izotopsko označenih spojin se lahko uporabijo postopki ločevanja, kot so TLC, HPLC ali GC ([2]), da se določi BKF ali BMF glede na matično snov. Kadar se uporabijo tehnike ločevanja, je treba identificirati ter količinsko opredeliti matično snov in ustrezne metabolite ([3]) (prim. odstavek 65), če naj bi BKF ali BMF temeljil na koncentraciji matične snovi v ribah, ne pa na skupnih izotopsko označenih ostankih. Študija bioakumulacije se lahko tudi združi s študijo metabolizma rib ali študijo porazdelitve *in vivo* z analizo in identifikacijo ostankov v tkivih. Možnost metabolizma se lahko predvidi z ustreznimi orodji (npr. orodje QSAR OECD (15) in lastniški programi QSAR).

Odločitev o tem, ali naj se izvede preskus vodne ali prehranske izpostavljenosti in kakšen naj bo načrt, mora temeljiti na dejavnikih iz odstavka 3 ob upoštevanju ustreznega regulativnega okvira. Na primer za snovi, ki imajo visoko vrednost log K_{OW}, ampak še vedno kažejo precejšnjo topnost v vodi glede na občutljivost razpoložljivih analitskih tehnik, je treba najprej obravnavati preskus vodne izpostavljenosti. Vendar je mogoče, da informacije o topnosti v vodi niso dokončne za te hidrofobne vrste snovi, zato je treba proučiti možnost priprave obstojnih, merljivih, raztopljenih koncentracij v vodi (obstojne emulzije niso dovoljene), ki se lahko uporabijo za študijo vodne izpostavljenosti, preden se sprejme odločitev o tem, katero preskusno metodo uporabiti (16). Ni mogoče zagotoviti točnih predpisanih smernic o metodi, ki naj se uporabi glede na topnost v vodi in merila za mejno vrednost porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda, saj lahko imajo drugi dejavniki (analitske tehnike, razgradnja, adsorpcija itd.) opazen vpliv na uporabnost metode zaradi zgoraj opisanih razlogov. Vendar vrednosti log K_{OW} nad 5 in topnost v vodi pod ~0,01–0,1 mg/l označujejo območje snovi, pri katerih lahko postane preskušanje prek vodne izpostavljenosti vedno težje.

Upoštevati je treba tudi druge dejavnike, ki lahko vplivajo na izbiro preskusa, vključno s potencialom snovi za adsorbcijo v preskusne posode in opremo ter njeno obstojnostjo v vodni raztopini v primerjavi z njeno obstojnostjo v ribji hrani (17), (18) itd.

Informacije o takih praktičnih vidikih so morda na voljo v drugih zaključenih študijah vodne izpostavljenosti. Nadaljnje informacije o vrednotenju vidikov v zvezi z učinkovitostjo bioakumulacijskih študij so na voljo v virih (npr. (19)).

Za snovi, pri katerih topnost ali ohranjanje koncentracije v vodi in analiza teh koncentracij ne predstavljata nobenih omejitev za izvedbo metode vodne izpostavljenosti, se priporoča ta metoda za določanje biokoncentracijskega potenciala

([1]) Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.
([2]) TLC: tankoplastna kromatografija; HPLC: visokotlačna tekočinska kromatografija; GC: plinska kromatografija.
([3]) V nekaterih regulativnih okvirih je analiza metabolitov morda obvezna, kadar so izpolnjeni določeni pogoji (prim. odstavek 65).

▼M7

snovi. V vsakem primeru je treba preveriti, da so koncentracije vodne izpostavljenosti, ki bodo uporabljene, v območju topnosti v vodi v preskusnih medijih. Uporabijo se lahko različne metode za ohranjanje obstojnih koncentracij raztopljene preskusne snovi, na primer uporaba osnovnih raztopin ali sistemov pasivnega odmerjanja (npr. metoda z izpiranjem kolone), če se lahko dokaže, da se lahko ohranijo obstojne koncentracije in da preskusni mediji niso drugačni od teh, priporočenih v odstavku 27.

Za močno hidrofobne snovi (log K_{OW} > 5 in topnost pod ~0,01–0,1 mg/l) lahko postane preskušanje prek vodne izpostavljenosti vedno težje. Razlogi za omejitve lahko zajemajo to, da se koncentracija v vodi ne more ohranjati na ravni, ki se šteje za dovolj konstantno (npr. zaradi sorpcije v steklo posode za izpostavljenost ali hitra absorpcija v ribe), ali da so koncentracije v vodi, ki bodo uporabljene, tako nizke, da so v istem območju ali pod analitsko mejo določljivosti ([1]). Za te močno hidrofobne snovi se priporoča prehranski preskus, če je ta preskus skladen z ustreznim regulativnim okvirom in potrebami po oceni tveganja.

Pri površinsko aktivnih snoveh je treba obravnavati, ali je preskus vodne biokoncentracije izvedljiv glede na lastnosti snovi, v nasprotnem primeru je verjetno primernejša prehranska študija. Površinsko aktivne snovi so snovi, aktivne na površini, ki znižujejo medploskovno napetost med dvema tekočinama. Zaradi njihove amfifilne narave (tj. imajo hidrofilni in hidrofobni del) se kopičijo na mejnih ploskvah, kot so mejna ploskev med vodo in zrakom, mejna ploskev med vodo in hrano ter steklena stena, kar ovira določanje njihove koncentracije v vodi.

Prehranski preskus lahko zaobide nekatere vidike izpostavljenosti za kompleksne zmesi s sestavinami, ki imajo različne meje topnosti v vodi, saj je primerljiva izpostavljenost vsem sestavinam zmesi verjetnejša kot pri vodni metodi (prim. (20)).

Opozoriti je treba, da se s prehranskim pristopom dobi prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF), ne pa biokoncentracijski faktor (BKF) ([2]). Na voljo so pristopi za ocenjevanje kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_K) na podlagi podatkov, dobljenih v prehranski študiji (kot je opisano v Dodatku 8, ampak te pristope je treba uporabljati previdno). Na splošno ti pristopi sledijo kinetiki prvega reda in se lahko uporabijo samo za določene skupine spojin. Teh pristopov verjetno ni mogoče uporabiti za površinsko aktivne snovi (glej odstavek 12).

Minimiziran načrt preskusa vodne izpostavljenosti z manjšim številom vzorčnih točk, da se zmanjša število živali in/ali virov (prim. od odstavka 83 naprej), se lahko uporabi samo za tiste snovi, za katere se lahko upravičeno pričakuje, da bosta absorpcija in očiščenje približno sledili kinetiki prvega reda (tj. na splošno neionizirane organske snovi, prim. odstavek 88).

C.13 – I: **Preskus vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije v ribah**

NAČELO PRESKUSA

Preskus zajema dve fazi: faza izpostavljenosti (absorpcija) in faza po izpostavljenosti (očiščenje). Med fazo absorpcije je skupina rib ene vrste izpostavljena preskusni snovi pri eni ali več izbranih koncentracijah, kar je odvisno od lastnosti preskusne snovi (prim. odstavek 49). Skupina rib se nato za fazo očiščenja

([1]) Na splošno bi izmerjene koncentracije v vodi med fazo absorpcije morale biti vsaj en red velikosti nad mejo določljivosti, zato da se lahko med fazo očiščenja v študiji lahko izmeri več razpolovnih dob obremenitve telesa.

([2]) Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

▼M7

prenese v medij, ki ne vsebuje preskusne snovi. Faza očiščenja je vedno potrebna, razen če je absorpcija snovi med fazo absorpcije zanemarljiva. Koncentracija preskusne snovi v/na ribah (ali določenih tkivih rib) se spremlja v obeh fazah preskusa. Poleg izpostavljene skupine se goji kontrolna skupina rib pod enakimi pogoji, le da ti ne vključujejo preskusne snovi, s čimer se morebitni neželeni učinki, opaženi med biokoncentracijskim preskusom, primerjajo z ustrezno kontrolno skupino, pridobijo pa se tudi koncentracije preskusne snovi v ozadju ([1]).

Pri preskusu vodne izpostavljenosti se faza absorpcije običajno izvaja 28 dni. Trajanje se lahko po potrebi podaljša (prim. odstavek 18) ali skrajša, če se dokaže, da je bilo stacionarno stanje doseženo prej (za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1). Trajanje faze absorpcije in čas, ki je potreben, da se doseže stacionarno stanje, se lahko predvidi z enačbami iz Dodatka 5. Faza očiščenja se nato začne, ko ribe niso več izpostavljene preskusni snovi, tako da se jih prenese v isti medij, vendar v čisto posodo brez preskusne snovi. Kadar je to mogoče, se biokoncentracijski faktor izračuna po možnosti kot razmerje koncentracije v ribah (C_f) in v vodi (C_w) v stacionarnem stanju (BKF_{SS}; glej Dodatek 1, opredelitev pojmov) in kot kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K; za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1), ki se oceni kot razmerje konstante hitrosti absorpcije (k_1) in očiščenja (k_2), ki sledita kinetiki prvega reda ([2]).

Če se stacionarno stanje ne doseže v 28 dneh, se izračuna BKF na podlagi kinetičnega pristopa (prim. odstavek 38), lahko pa se podaljša faza absorpcije. Če bi to pomenilo nepraktično dolgo fazo absorpcije, da se doseže stacionarno stanje (prim. odstavka 37 in 38, Dodatek 5), se priporoča kinetični pristop. Za močno hidrofobne snovi pa je treba obravnavati izvedbo prehranske študije ([3]), če je prehranski preskus skladen z ustreznim regulativnim okvirom.

Konstanta hitrosti absorpcije, konstanta hitrosti očiščenja (izgube) (ali konstante, kadar se uporabijo kompleksnejši modeli), biokoncentracijski faktor (stacionarni in/ali kinetični) in, kadar je to mogoče, meje zaupanja za vsakega od teh parametrov se izračunajo na podlagi modela, ki najbolje opisuje izmerjene koncentracije preskusne snovi v ribah in vodi (prim. Dodatek 5).

Povečanje mase rib med preskusom povzroči zmanjšanje koncentracije preskusne snovi v rastočih ribah (ki se imenuje razredčitev zaradi rasti), zato je kinetični BKF prenizko ocenjen, če se ga ne popravi na podlagi rasti (prim. odstavka 72 in 73).

BKF temelji na skupni koncentraciji v ribi (tj. na celotno mokro težo ribe). Vendar se za posebne namene lahko uporabijo določena tkiva ali organi (npr. mišice, jetra), če so ribe dovolj velike, ali pa se ribe razdelijo na užitne (fileji) in neužitne (drobovje) dele. Ker za mnoge organske snovi velja jasna povezava med potencialom za biokoncentracijo in hidrofobnost, obstaja tudi ustrezno razmerje med vsebnostjo lipidov v preskusnih ribah in ugotovljeno biokoncentracijo takih snovi. Da bi se zmanjšal ta vir variabilnosti v rezultatih preskusa za te snovi z visoko lipofilnostjo (tj. z vrednostjo log $K_{OW} > 3$), je treba

([1]) Večine preskusnih snovi se načeloma ne sme zaznati v kontrolni vodi. Koncentracije ozadja bi morale biti pomembne samo za naravno prisotne materiale (npr. nekatere kovine) in snovi, ki so splošno prisotne v okolju.

([2]) Če kinetika prvega reda očitno ni upoštevana, je treba uporabiti kompleksnejše modele (glej vire v *Dodatku 5*) in poiskati nasvet biostatistika.

([3]) Absorpcija je lahko omejena pri nizkih koncentracijah izpostavljenosti zaradi nizke topnosti v vodi pri preskusu biokoncentracije, pri prehranskem preskusu pa se lahko dosežejo veliko višje koncentracije izpostavljenosti.

▼M7

biokoncentracijo izraziti kot normalizirano na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov (glede na celotno mokro težo telesa) poleg te, ki se izpelje neposredno iz študije. To je potrebno, da se zagotovi podlaga, na podlagi katere se lahko primerjajo rezultati za različne snovi in/ali preskusne vrste. Pogosto se uporablja 5-odstotna vsebnost lipidov, saj predstavlja povprečno vsebnost lipidov v ribah, ki se običajno uporabljajo pri tej preskusni metodi (21).

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

Poleg lastnosti preskusne snovi, navedene v uvodu (odstavek 3), so zahtevane tudi informacije o toksičnosti za vrsto rib, ki bo uporabljena v preskusu, po možnosti asimptotični LC_{50} (tj. neodvisen od časa) in/ali toksičnost, ki je bila ocenjena v dolgotrajnih preskusih pri ribah (npr. TM C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Na voljo mora biti ustrezna analitska metoda z znano točnostjo, natančnostjo in občutljivostjo, saj mora biti na voljo količinska opredelitev snovi v preskusnih raztopinah in biološkem materialu ter podrobnosti o pripravi in shranjevanju vzorca. Ravno tako mora biti znana analitska meja določljivosti preskusne snovi v vodi in ribjih tkivih. Kadar se uporabi izotopsko označena preskusna snov, mora ta imeti najvišjo čistost (npr. po možnosti > 98 %), in znan mora biti odstotek radioaktivnosti, povezan z nečistočami.

VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

sprememba temperature mora znašati manj kot ± 2 °C, saj lahko velika odstopanja vplivajo na biološke parametre, ki so pomembni za absorpcijo in očiščenje, ter povzročajo stres pri živalih;

koncentracija raztopljenega kisika ne sme pasti pod 60 % nasičenosti;

koncentracija preskusne snovi v komorah se ohranja v območju ± 20 % povprečja izmerjenih vrednosti med fazo absorpcije;

koncentracija preskusne snovi je pod mejo topnosti v vodi, pri čemer se upošteva učinek, ki ga lahko ima preskusna voda na dejansko topnost ([1]);

smrtnost ali drugi neželeni učinki/bolezni pri kontrolnih in tretiranih ribah znašajo ob koncu preskusa manj kot 10 %; kadar preskus traja več tednov ali mesecev, morajo smrtnost ali drugi neželeni učinki v obeh skupinah rib znašati manj kot 5 % na mesec in skupno ne smejo presegati 30 %. Precejšnje razlike v povprečni rasti med preskusnimi in kontrolnimi skupinami vzorčenih rib so lahko pokazatelj toksičnega učinka preskusne snovi.

REFERENČNE SNOVI

Uporaba referenčnih snovi z znanim biokoncentracijskim potencialom in nizkim metabolizmom bi bila uporabna za preverjanje preskusnega postopka, kadar je to zahtevano (npr. ko laboratorij nima predhodnih izkušenj s preskusom ali so bili spremenjeni preskusnimi pogoji).

([1]) Za snovi z več sestavinami, UVCB in zmesi je treba upoštevati topnost v vodi vsake ustrezne sestavine, da se določijo ustrezne koncentracije izpostavljenosti.

▼M7

OPIS METODE

Oprema

Za vse dele opreme se je treba izogniti uporabi materialov, ki se lahko raztopijo, sorbirajo ali lužijo in imajo neželen učinek na ribe. Uporabijo se lahko standardni pravokotni ali valjasti bazeni iz kemično inertnega materiala in ustrezne prostornine, ki je v skladu s stopnjo obremenitve (prim. odstavek 43). Čim manj je treba uporabljati cevni material iz mehke plastike. Uporabiti je treba cevni material iz politetrafluoroetilena, nerjavnega jekla in/ali stekla. Na podlagi izkušenj je za preskusne snovi z visokim koeficientom adsorpcije, na primer sintetične piretroide, morda treba uporabiti silanizirano steklo. V takih primerih je treba opremo po uporabi zavreči. Priporočeno je, da se preskusne sisteme izpostavi koncentracijam preskusne snovi, ki bodo uporabljene v študiji, za tako dolgo, kot je potrebno, da se dokaže ohranjanje obstojnih koncentracij izpostavljenosti, preden se doda preskusne organizme.

Voda

Za preskus se običajno uporablja naravna voda, ki mora biti pridobljena iz neonesnaženega vira enotne kakovosti. Morda pa je primernejša modelna razredčevalna voda (tj. demineralizirana voda, ki so ji dodana določena hranila v znanih količinah), da se zagotovi enotna kakovost v daljšem časovnem obdobju. Voda za redčenje oziroma voda, ki je zmešana s preskusno snovjo, preden je dodana v preskusno posodo (*prim.* odstavek 30), mora biti take kakovosti, ki omogoči preživetje izbrane vrste rib ves čas trajanja aklimatizacije in preskušanja, ne da bi pri tem ta vrsta neobičajno spremenila videz ali vedenje. Načeloma je treba dokazati, da lahko preskusne vrste preživijo, rastejo in se razmnožujejo v vodi za redčenje (npr. v laboratorijski kulturi ali preskusu strupenosti življenjskega cikla). Voda za redčenje mora biti opredeljena vsaj s pH, trdoto, vsemi snovmi v trdem stanju in skupnim organskim ogljikom (TOC ()), če je mogoče, pa tudi z amonijem, nitritom in alkalnostjo ter slanostjo za morske vrste. Parametri, ki so pomembni za optimalno počutje rib, niso povsem znani, vendar so v Dodatku 2 navedene priporočene najvišje koncentracije številnih parametrov za sladko in morsko preskusno vodo.

Voda za redčenje mora biti ves čas preskusa enake kakovosti. Vrednost pH mora biti ob začetku preskusa v območju 6,0 do 8,5, med danim preskusom pa mora biti v območju ± 0,5 pH enot. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksiranjem preskusne snovi) ali imela neželen učinek na vedenje staleža rib, je treba v časovnih intervalih vzeti vzorce za analizo, vsaj na začetku in koncu preskusa. Določiti je treba težke kovine (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavne anione in katione (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} in SO_4^{2-}), pesticide (npr. skupni organofosforni in skupni organoklorni pesticidi), skupni organski ogljik in suspendirane trdne snovi, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje razmeroma konstantne kakovosti. Če se dokaže, da je bila kakovost vode za redčenje konstantna vsaj eno leto, se lahko analize izvajajo manj pogosto, časovni intervali pa se lahko podaljšajo (npr. vsakih šest mesecev).

Vsebnost naravnih delcev in skupni organski ogljik vode za redčenje morata biti čim nižja, da se prepreči adsorpcija preskusne snovi na organsko snov, saj lahko to zmanjša njeno biološko dostopnost, to pa lahko pomeni prenizko oceno BKF. Najvišja sprejemljiva vrednost je 5 mg/l za delce (suha snov, ki jo zadrži 0,45 μm filter) in 2 mg/l za skupni organski ogljik (*prim.* Dodatek 2). Voda za redčenje se

() TOC vključuje organski ogljik iz delcev in raztopljeni organski ogljik, tj. TOC=POC + DOC.

▼M7

mora po potrebi pred uporabi filtrirati. Preskusne ribe (izločki) in ostanki hrane morajo čim manj prispevati k vsebnosti organskega ogljika v preskusni vodi (*prim.* odstavek 46).

Preskusne raztopine

Pripravi se osnovna raztopina preskusne snovi z ustrezno koncentracijo. Po možnosti je treba osnovno raztopino pripraviti s preprostim mešanjem ali stresanjem preskusne snovi v vodi za redčenje. V nekaterih primerih je morda ustrezno uporabiti drugo možnost, in sicer sistem odmerjanja za desorpcijo iz trdne faze. Na splošno se ne priporoča uporaba topil in disperzijskih sredstev (sredstev za raztapljanje) (prim. (25)); uporaba teh materialov pa je morda sprejemljiva, da se pridobi osnovna raztopina z ustrezno koncentracijo, vendar si je treba čim bolj prizadevati, da se taki materiali uporabljajo čim manj in da se ne preseže njihova kritična koncentracija tvorbe micel (kadar je to ustrezno). Topila, ki se lahko uporabijo, so aceton, etanol, metanol, dimetilformamid in trietilen glikol; disperzijska sredstva, ki so se uporabila, so Tween 80, metilceluloza 0,01 % in HCO-40. Koncentracija topila v končnem preskusnem mediju mora biti enaka v vseh tretiranjih (tj. neodvisno od koncentracije preskusne snovi) in ne sme presegati ustreznih pragov toksičnosti, ki so bili določeni za topilo v preskusnih pogojih. Najvišja raven je koncentracija, ki znaša 100 mg/l (ali 0,1 ml/l). Koncentracija topila, ki znaša 100 mg/l, verjetno ne bo zelo spremenila najvišje raztopljene koncentracije preskusne snovi, ki jo je mogoče doseči v mediju (25). Znano mora biti, koliko prispeva topilo (skupaj s preskusno snovjo) k skupni vsebnosti organskega ogljika v preskusni vodi. Koncentracija skupnega organskega ogljika v preskusnih posodah ves čas preskusa ne sme preseči koncentracije organskega ogljika, ki izvira iz preskusne snovi, ter topila ali sredstva za raztapljanje ([1]), kadar se uporabi, za več kot 10 mg/l (± 20 %). Vsebnost organske snovi lahko precej vpliva na količino prosto raztopljene preskusne snovi med pretočnimi preskusi na ribah, zlasti za zelo lipofilne snovi. Mikroekstrakcija na trdni fazi (prim. odstavek 60) lahko zagotovi pomembne informacije o razmerju med vezanimi in prosto raztopljenimi spojinami, slednje pa naj bi predstavljale biološko dostopen del. Koncentracija preskusne snovi mora biti pod mejo topnosti preskusne snovi v preskusnih medijih kljub uporabi topila ali sredstva za raztapljanje. Ob uporabi lahko biorazgradljivih topil je treba biti previden, saj lahko povzročijo težave z rastjo bakterij v pretočnih preskusih. Če ni mogoče pripraviti osnovne raztopine brez uporabe sredstva za raztapljanje, je treba obravnavati ustreznost študije vodne izpostavljenosti v primerjavi s študijo prehranske izpostavljenosti.

Za pretočne preskuse je potreben sistem, ki neprestano dovaja in redči osnovno raztopino preskusne snovi (npr. metrična črpalka, proporcionalni razredčevalnik, nasičevalnik), ali sistem odmerjanja za desorpcijo iz trdne faze, da se lahko dovajajo preskusne koncentracije v preskusne komore. Po možnosti se mora v vsaki preskusni komori zamenjati vsaj pet prostornin na dan. Priporočena je pretočna metoda, kadar pa to ni mogoče (npr. ko obstajajo neželeni učinki na preskusne organizme), se lahko uporabi polstatična tehnika, če so izpolnjena merila za veljavnost (*prim.* odstavek 24). Hitrost pretoka osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba preveriti 48 ur pred preskusom in nato vsak dan med preskusom. V to preverjanje je treba zajeti določanje hitrosti pretoka skozi vsako preskusno komoro in zagotoviti, da se ne spreminja za več kot 20 % v komori ali med njimi.

([1]) Čeprav to na splošno ni priporočeno, je ob uporabi topila ali sredstva za raztapljanje treba dodati organski ogljik, ki izvira iz tega sredstva, k organskemu ogljiku iz preskusne snovi, da se oceni koncentracija organskega ogljika v preskusnih posodah.

▼M7

Izbira vrst

Pomembna merila za izbiro vrst so, da so lahko dostopne, da so na razpolago v primernih velikostih in da se lahko ustrezno gojijo v laboratoriju. Druga merila za izbiro rib vključujejo rekreacijsko, komercialno in ekološko pomembnost ter primerljivo občutljivost, preteklo uspešno uporabo itd. Priporočene preskusne vrste so navedene v Dodatku 3. Uporabijo se lahko tudi druge vrste, vendar je morda treba prilagoditi preskusni postopek, da se zagotovijo ustrezni preskusni pogoji. V tem primeru je treba utemeljiti izbiro vrste in preskusne metode. Na splošno uporaba manjših vrst rib skrajša čas za doseganje stacionarnega stanja, ampak je verjetno potrebnih več rib (vzorcev), da se ustrezno analizira vsebnost lipidov in koncentracij preskusne snovi v ribah. Poleg tega lahko razlike v hitrosti dihanja in metabolizmu med mladimi in starejšimi ribami ovirajo primerjave rezultatov med različnimi preskusi in preskusnimi vrstami. Opozoriti je treba, da lahko vrste rib, preskušene med življenjskim ciklom s hitro rastjo (mlade ribe), otežijo razlago podatkov.

Vzdrževanje rib (pomembno za vodno in prehransko izpostavljenost)

Populacija staleža rib se mora vsaj dva tedna aklimatizirati v vodi (*prim.* odstavek 28) pri preskusni temperaturi in ves čas ji je treba zagotavljati zadostno hrano (prim. odstavek 45). Voda in hrana morata biti iste vrste kot tisti, ki bosta uporabljeni med preskusom.

Po 48 urah prilagajanja se zabeleži smrtnost in uporabijo se naslednja merila:

— smrtnost, ki v sedmih dneh preseže 10 % populacije: zavrne se celotna serija;

— smrtnost, ki v sedmih dneh znaša od 5 do 10 % populacije: serija se mora aklimatizirati dodatnih sedem dni in če je v drugih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se zavrne celotna serija;

— smrtnost, ki v sedmih dneh znaša manj kot 5 % populacije: serija se sprejme.

Ribe, uporabljene v preskusih, morajo biti brez vidnih bolezni in anomalij. Vse bolne ribe je treba zavreči. Ribe v dveh tednih pred preskusom ali med poskusom ne smejo biti zdravljene zaradi bolezni.

IZVEDBA PRESKUSA

Predhodni preskus

Morda je uporabno izvesti predhodni poskus, da se optimizirajo preskusni pogoji dokončnega preskusa, npr. izbira koncentracij preskusne snovi ter trajanje faze absorpcije in očiščenja, ali da se določi, ali je treba izvesti popoln preskus. Načrt predhodnega preskusa mora biti tak, da se pridobijo zahtevane informacije. Obravnava se lahko, ali bo za izračun BKF morda zadoščal minimiziran preskus ali pa bo potrebna popolna študija (prim. odstavke 83–95 o minimiziranem preskusu).

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje faze absorpcije

Trajanje faze absorpcije je mogoče napovedati na podlagi praktičnih izkušenj (npr. iz pretekle študije ali študije akumulacije o strukturno sorodni snovi) ali določenih empiričnih razmerij, ki temeljijo na znanju o topnosti v vodi ali porazdelitvenem koeficientu n-oktanol/voda preskusne snovi (pod pogojem, da absorpcija sledi kinetiki prvega reda, prim. Dodatek 5).

▼M7

Fazo absorpcije je treba izvajati 28 dni, razen če se lahko dokaže, da je bilo stacionarno stanje doseženo že prej (za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1). Stacionarno stanje je doseženo v grafičnem prikazu preskusne snovi v ribah (C_f) v odvisnosti od časa, ko krivulja postane vzporedna s časovno osjo in so tri zaporedne analize C_f na vzorcih, vzetih v intervalu najmanj dveh dni, v območju ± 20 % druga od druge ter ni precejšnjega povečanja C_f v času med prvo in zadnjo zaporedno analizo. Pri analiziranju združenih vzorcev so potrebne najmanj štiri zaporedne analize. Za preskusne snovi, ki se absorbirajo počasi, so primernejši sedemdnevni intervali. Če stacionarno stanje ni bilo doseženo v 28 dneh, se izračuna BKF s kinetičnim pristopom, ki ni odvisen od doseganja stacionarnega stanja, ali pa se podaljša fazo absorpcije in opravlja nadaljnje meritve, dokler ni doseženo stacionarno stanje ali 60 dni, kar koli od tega je krajše. Koncentracija preskusne snovi v ribah ob koncu faze absorpcije mora tudi biti dovolj visoka, da se zagotovi zanesljiva ocena k_2 iz faze očiščenja. Če se po 28 dneh ne pokaže znatna absorpcija, se lahko preskus ustavi.

Trajanje faze očiščenja

Za snovi, ki sledijo kinetiki prvega reda, je polovica obdobja trajanja faze absorpcije običajno dovolj za ustrezno (npr. 95 %) zmanjšanje v obremenitvi telesa za snov (prim. Dodatek 5 za razlago ocene). Če je čas, ki je potreben, da se doseže 95 % izgube, nepraktično dolg in na primer dvakrat daljši od normalnega trajanja faze absorpcije (tj. več kot 56 dni), se lahko uporabi krajše obdobje (npr. kadar koncentracija preskusne snovi znaša manj kot 10 % koncentracije v stacionarnem stanju). Za snovi z bolj zapletenimi vzorci absorpcije in očiščenja, kot jih predstavlja enodelni model za ribe, ki zagotavlja kinetiko prvega reda, pa bodo morda potrebne daljše faze očiščenja. Če se opazijo in/ali predvidevajo taki zapleteni vzorci, se priporoča, da se poišče nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika, da se zagotovi ustrezen načrt preskusa. Če se čas očiščenja podaljša, je lahko na voljo manjše število rib za vzorčenje, razlike v rasti med ribami pa lahko vplivajo na rezultate. Na to obdobje lahko vpliva tudi obdobje, v katerem koncentracija preskusne snovi v ribah ostane nad analitsko mejo določljivosti.

Število preskusnih rib

Število rib na preskusno koncentracijo je treba izbrati tako, da so za vsako vzorčno točko na voljo najmanj štiri ribe. Ribe se lahko združi samo, če analiza posameznih rib ni izvedljiva. Če se namerava pridobiti višja natančnost pri prilagajanju krivulje (in izpeljanih parametrih) ali če so potrebne študije o metabolizmu (npr. za razlikovanje med metaboliti in matično snovjo pri uporabi izotopsko označenih preskusnih snovi), je potrebnih več rib na vzorčno točko. Vsebnost lipidov je treba določiti na istem biološkem materialu, kot se uporablja za določanje koncentracije preskusne snovi. Če to ni izvedljivo, bodo mora potrebne dodatne ribe (*prim.* odstavka 56 in 57).

Če se uporabijo odrasle (tj. spolno zrele) ribe, ne smejo biti v stanju drstenja ali nedavno po drstitvi (tj. so se že drstile) pred ali med preskusom. V poročilu je treba tudi navesti, ali so bili v preskusu uporabljeni ribji samci ali samice ali oboji. Če se uporabita oba spola, je treba pred začetkom izpostavljenosti zabeležiti, da so razlike v rasti in vsebnosti lipidov med spoloma zanemarljive, zlasti če se predvideva, da bo treba združiti ribje samce in samice, da se zagotovijo zaznavne koncentracije snovi in/ali vsebnost lipidov.

▼M7

Za kateri koli preskus se izberejo ribe podobne teže, tako da najmanjše niso manjše od dveh tretjin teže največjih. Vse morajo biti vzgojene v istem letu in prihajati iz istega vira. Ker lahko teža in starost ribe precej vplivata na vrednosti BKF (12), je treba te podrobnosti točno zabeležiti. Priporočeno je, da se malo pred preskusom stehta podvzorec staleža rib, da se oceni povprečna teža (prim. odstavek 61).

Obremenitev

Uporabiti je treba visoka razmerja med vodo in ribami, da se čim bolj zmanjša upadanje koncentracije preskusne spojine v vodi zaradi dodajanja rib na začetku preskusa in da se prepreči zmanjšanje koncentracij raztopljenega kisika. Pomembno je, da stopnja obremenitve ustreza uporabljenim preskusnim vrstam. V vsakem primeru se običajno priporoča stopnja obremenitve med vodo in ribami, ki znaša 0,1–1,0 g rib (mokra teža) na liter vode na dan. Visoke stopnje obremenitve med vodo in ribami se lahko uporabijo, če se pokaže, da se zahtevana koncentracija preskusne snovi lahko ohranja v območju ± 20 % mejnih vrednosti, in da koncentracija raztopljenega kisika ne pade pod 60 % nasičenosti (*prim.*odstavek 24).

Pri izbiri ustreznih režimov obremenitve je treba upoštevati naravni habitat vrste rib. Na primer ribe, ki živijo pri dnu, morda zahtevajo več prostora na dnu akvarija pri enaki prostornini vode v primerjavi z vrstami pelagičnih rib.

Hranjenje

Med aklimatizacijo in preskušanjem se ribe hranijo z ustrezno hrano, ki ima znano vsebnost lipidov in skupnih proteinov, v zadostnih količinah, ki zagotavljajo zdravo stanje in ohranjanje telesne teže (nekaj rasti je dovoljene). Ribe se med prilagajanjem in preskušanjem hranijo vsakodnevno in z vnaprej določeno količino hrane glede na uporabljeno vrsto, preskusne pogoje in kalorično vrednost hrane (na primer za šarenko približno 1 do 2 % telesne teže na dan). Stopnjo hranjenja je treba izbrati tako, da se prepreči hitra rast in veliko povečanje vsebnosti lipidov. Da se ohrani enaka stopnja hranjenja, je treba količino hrane po potrebi znova ustrezno izračunati, na primer enkrat na teden. Za ta izračun se lahko teža rib v vsaki preskusni komori oceni glede na težo ribe, ki je bila nazadnje vzorčena v tej komori. Ribe, ki ostanejo v komori, se ne tehtajo.

Ostanki hrane in iztrebki se iz preskusnih komor izčrpajo vsak dan kmalu po hranjenju (v 30 minutah do ene ure). Posode morajo biti ves čas preskusa čim bolj čiste, da ostane koncentracija organskih snovi čim nižja (prim. odstavek 29), saj lahko prisotnost organskega ogljika omeji biološko dostopnost preskusne snovi (12).

Ker veliko hrane temelji na ribji moki, je treba zagotoviti, da hrana ne bo vplivala na rezultate preskusa ali povzročila neželenih učinkov, npr. ker vsebuje (sledove) pesticidov, težkih kovin in/ali same preskusne snovi.

Svetloba in temperatura

Priporoča se obdobje osvetljenosti od 12 do 16 ur in temperatura (± 2 °C) mora biti ustrezna za preskusno vrsto (prim. Dodatek 3). Vrsta in lastnosti svetlobe morajo biti znane. Paziti je treba na morebitno fototransformacijo preskusne snovi pod obsevalnimi pogoji študije. Uporabiti je treba ustrezno svetlobo, da se prepreči izpostavljenost rib nenaravnim fotoproduktom. V nekaterih primerih je morda ustrezno uporabiti filter, da se zaustavi obsevanje UV pod 290 nm.

▼M7

Preskusne koncentracije

Preskus je bil izvorno zasnovan za nepolarne organske snovi. Za to vrsto snovi se pričakuje, da je dovolj izpostavljenost rib eni koncentraciji, saj niso pričakovani nobeni učinki koncentracije, čeprav sta morda zahtevani dve koncentraciji zaradi ustreznega regulativnega okvira. Če se preskušajo snovi, ki ne sodijo v to področje, ali so znane druge indikacije morebitne odvisnosti od koncentracije, je treba izvesti preskus z dvema ali več koncentracijami. Če se preskuša samo ena koncentracija, je treba utemeljiti uporabo ene koncentracije (prim. odstavek 79). Preskusna koncentracija mora biti tako nizka, kot je praktično ali tehnično izvedljivo (tj. ne preblizu meje topnosti).

V nekaterih primerih se lahko predvideva, da je biokoncentracija snovi odvisna od koncentracije vode (npr. za kovine, pri katerih se lahko absorpcija v ribe vsaj delno regulira). V takem primeru je potrebno, da se preskusita vsaj dve, po možnosti pa več koncentracij (prim. odstavek 49), ki so ustrezne za okolje. Tudi za snovi, pri katerih morajo biti preskušene koncentracije blizu meje topnosti zaradi praktičnih razlogov, se priporoča preskušanje vsaj dveh koncentracij, saj lahko to zagotovi razumevanje zanesljivosti koncentracij izpostavljenosti. Izbira preskusnih koncentracij mora zajeti koncentracijo, ki je realna za okolje, in koncentracijo, ki je pomembna za namen določene ocene.

Koncentracije preskusne snovi je treba izbrati tako, da so pod njeno ravnijo kroničnega učinka ali 1 % akutnega asimptotičnega LC_{50}, v območju, ki je ustrezen za okolje, in vsaj en red velikosti nad njeno mejo določljivosti v vodi z uporabljeno analitsko metodo. Največja dovoljena preskusna koncentracija se lahko določi tudi z deljenjem akutnega 96-urnega LC_{50} z ustreznim akutnim/kroničnim razmerjem (npr. ustrezna razmerja za nekatere snovi so približno tri, nekaj pa jih je nad 100). Če se uporabi druga koncentracija, mora biti za desetkratnik drugačna od navedene. Če to ni mogoče zaradi merila toksičnosti (ki omejuje zgornjo preskusno koncentracijo) in analitske meje (ki omejuje spodnjo preskusno koncentracijo), se lahko uporabi manjši faktor od deset in treba je obravnavati uporabo izotopsko označene preskusne snovi (z najvišjo čistostjo, npr. po možnosti > 98 %). Zagotoviti je treba, da nobena uporabljena koncentracija ni nad mejo topnosti preskusne snovi v preskusnih medijih.

Kontrole

Poleg preskusne serije je treba izvesti eno kontrolo z vodo za redčenje ali, če je ustrezno (prim. odstavka 30 in 31), eno kontrolo s topilom.

Pogostost meritev kakovosti vode

Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, TOC, pH in temperaturo v vseh preskusnih in kontrolnih posodah. Skupna trdota in slanost (če je ustrezno) se morata meriti v kontrolah in eni posodi. Če se preskušata ena dve več koncentracij, se ti parametri merijo pri višji (ali najvišji) koncentraciji. Raztopljeni kisik in slanost (če je ustrezno) se morata meriti najmanj trikrat – na začetku, približno na sredini in na koncu faze absorpcije – in enkrat tedensko v fazi očiščenja. TOC je treba izmeriti na začetku preskusa (24 in 48 ur pred začetkom faze absorpcije v preskusu), preden se dodajo ribe, in najmanj enkrat tedensko med fazo absorpcije in očiščenja. Temperaturo je treba meriti in beležiti vsak dan, pH na začetku in koncu vsake faze, trdoto pa enkrat na preskus. Temperaturo je treba po možnosti neprestano nadzirati v vsaj eni posodi.

▼M7

Vzorčenje ter analiza rib in vode

Časovni razpored vzorčenja rib in vode

Vodo je treba vzorčiti iz preskusnih komor, da se določi koncentracija preskusne snovi, preden se dodajo ribe ter med fazo absorpcije in očiščenja. Vodo je treba vzorčiti pred hranjenjem, ob istem času kot se vzorči ribe. Morda je uporabno pogostejše vzorčenje, da se zagotovijo stacionarne koncentracije po dodajanju rib. Med fazo absorpcije je treba določiti koncentracije preskusne snovi, da se preveri skladnost z merili za veljavnost (odstavek 24). Če se z analizami vzorcev vode na začetku faze očiščenja ne zazna preskusne snovi, se to lahko uporabi kot utemeljitev, zakaj se v preostali fazi očiščenja ne bodo opravile meritve preskusne in kontrolne vode za preskusno snov.

Ribe je treba za preskusno snov vzorčiti vsaj petkrat med fazo absorpcije in vsaj štirikrat med fazo očiščenja. Ker je v nekaterih primerih na podlagi tega števila vzorcev (zlasti če ni nakazana preprosta kinetika absorpcije in očiščenja prvega reda) težko izračunati ustrezno natančno oceno vrednosti BKF, je morda priporočljivo v obeh fazah odvzeti vzorce pogosteje (prim. Dodatek 4).

Vsebnost lipidov je treba določiti na istem biološkem materialu, kakršen se uporablja za določanje koncentracije preskusne snovi, vsaj na začetku in koncu faze absorpcije ter ob koncu faze očiščenja. Če to ni izvedljivo, je treba vzorčiti vsaj tri neodvisne ribe, da se določi vsebnost lipidov v vsaki od istih treh časovnih točk. Ustrezno je treba prilagoditi število rib na bazen na začetku preskusa ([1]). Če pa se v kontrolnih ribah (tj. ribah iz populacije staleža) ne zaznajo znatne količine preskusne snovi, se lahko analizira kontrolne ribe iz preskusa samo za vsebnost lipidov, analizo preskusne snovi v preskusnih skupinah (in z njo povezane konstanto hitrosti absorpcije, konstanto hitrosti očiščenja in vrednosti BKF) pa se lahko popravi glede na spremembe v skladu z vsebnostjo lipidov v kontrolni skupini med preskusom ([2]).

Mrtve ali bolne ribe se ne smejo analizirati glede koncentracije preskusne snovi ali lipidov.

Primer sprejemljivega časovnega razporeda vzorčenja je naveden v Dodatku 4. Drugi režimi se lahko preprosto izračunajo z drugimi predvidenimi vrednostmi K_{OW}, da se izračuna čas izpostavljenosti za 95-odstotno absorpcijo (glej Dodatek 5 za izračune).

Vzorčenje je treba nadaljevati med fazo absorpcije, dokler se ne vzpostavi stacionarno stanje (za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1) ali dokler se drugače ne konča faza absorpcije (po 28 ali 60 dneh, prim. odstavka 37 in 38). Pred začetkom faze očiščenja je treba ribe prenesti v čiste posode.

Vzorčenje in priprava vzorcev

Pridobiti je treba vzorce vode za analizo, na primer tako da se voda prek inertnega cevnega materiala izčrpa iz središčne točke preskusne posode. Filtriranje in centrifugiranje ne ločita vedno biološko nedostopnega dela preskusne snovi od tega, ki je biološko dostopen. Če se uporabi tehnika ločevanja, je treba zaradi težav z biološko dostopnostjo v poročilu o preskusu vedno zagotoviti utemeljitev ali validacijo tehnike ločevanja (25). Vzorci pa se ne smejo tako tretirati zlasti v

([1]) Če se vsebnost lipidov ne analizira na istih ribah kot preskusna snov, morajo ribe imeti vsaj podobno težo in (če je to pomembno) biti istega spola.

([2]) Ta možnost se lahko uporabi samo, če se ribe v vseh preskusnih skupinah gojijo v podobnih velikostih skupin, če so odstranjene po istem vzorcu in hranjene na enak način. To zagotovi, da je rast rib v vseh preskusnih skupinah podobna, če je preskušana koncentracija pod mejo območja toksičnosti. Če je rast podobna, se pričakuje, da bo podobna tudi vsebnost lipidov. Drugačna rast v kontrolni skupini bi kazala na učinek snovi, zaradi česar bi se študija razveljavila.

▼M7

primeru močno hidrofobnih snovi (tj. snovi, ki imajo log K_{OW} > 5) (12), (26), pri katerih lahko pride do adsorpcije na matriko filtra ali centrifugirne posode. Namesto tega je treba zagotoviti, da so bazeni čim bolj čisti (prim. odstavek 46), vsebnost skupnega organskega ogljika pa je treba spremljati v fazi absorpcije in očiščenja (prim. odstavek 53). Da se preprečijo morebitne težave z manjšo biološko dostopnostjo, se lahko za slabo topne in močno hidrofobne snovi uporabi vzorčenje na podlagi tehnik mikroekstrakcije na trdni fazi.

Vzorčene ribe je treba takoj evtanazirati z najustreznejšo in najbolj humano metodo (za meritve celih rib se ne smejo opravljati nobeni nadaljnji postopki razen spiranja z vodo (prim. odstavek 28) in sušenja ribe s pivnikom). Izmeriti je treba težo in skupno dolžino ([1]). Za vsako posamezno ribo je treba izmerjeno težo in dolžino povezati z analizirano koncentracijo snovi (in vsebnostjo lipidov, kadar je to ustrezno), na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo.

Ribe in vodo je po možnosti treba analizirati takoj po vzorčenju, da se prepreči razgradnja ali druge izgube ter da se med izvajanjem preskusa izračunata približni konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja. S takojšnjo analizo se preprečijo tudi zamude pri določanju, kdaj je bilo doseženo stacionarno stanje.

Če se analiza ne izvede takoj, je treba vzorce shraniti na ustrezen način. Pred začetkom študije je treba pridobiti informacije o pravilni metodi shranjevanja za določeno preskusno snov, na primer globoka zamrznitev, shranjevanje pri 4 °C, ekstrakcija itd. Trajanje shranjevanja je treba izbrati tako, da se zagotovi, da se snov med shranjevanjem ne razgradi.

Kakovost analitske metode

Ker so za celoten postopek pomembne predvsem točnost, natančnost in občutljivost analitske metode, uporabljene za preskusno snov, je treba preveriti s preskušanjem, da so natančnost, točnost in obnovljivost analize snovi ter izkoristek preskusne snovi iz vode in rib zadovoljivi za določeno metodo. To mora biti del predhodnih preskusov. Preveriti je treba tudi, da preskusne snovi ni mogoče zaznati v vodi za redčenje. Vrednosti koncentracij preskusne snovi v vodi in ribah, ki so bile pridobljene s preskusi za izkoristke in vrednosti ozadja za kontrole, je treba po potrebi popraviti. Z vzorci rib in vode je treba ves čas ravnati tako, da se čim bolj zmanjša onesnaženost in izguba (npr. zaradi adsorpcije na napravo za vzorčenje).

Analiza vzorcev rib

Če se v preskusu uporabljajo izotopsko označeni materiali, se lahko analizira skupni izotopski označevalec (tj. matična snov in metaboliti) ali pa se vzorci očistijo, zato da se lahko matična snov analizira ločeno. Če naj bi BKF temeljil na matični snovi, je treba opredeliti glavne metabolite vsaj ob koncu faze absorpcije (prim. odstavek 6). Glavni metaboliti so tisti, ki predstavljajo ≥ 10 % skupnih ostankov v ribjih tkivih, tisti, ki predstavljajo ≥ 5 % v dveh zaporednih točkah vzorčenja, tisti, ki kažejo rastoče ravni med celotno fazo absorpcije, in tisti z znanim toksikološkim učinkom. Če BKF za celo ribo v smislu skupnih izotopsko označenih ostankov znaša ≥ 500, je morda dobro, za določene kategorije snovi, kot so pesticidi, pa močno priporočljivo, identificirati in količinsko

([1]) Poleg teže je treba zabeležiti skupno dolžino, saj je primerjava obsega povečanja dolžine med preskusom dober pokazatelj tega, ali je prišlo do neželenega učinka.

▼M7

opredeliti glavne metabolite. Nekateri regulativni organi morda zahtevajo količinsko opredelitev takih metabolitov. Če so identificirani in količinsko opredeljeni razkrojki, ki predstavljajo > 10 % skupnih izotopsko označenih ostankov v ribjem tkivu, je nato tudi priporočljivo, da se identificirajo in količinsko opredelijo razkrojki v preskusni vodi. Če to ni izvedljivo, je to treba pojasniti v poročilu.

Koncentracijo preskusne snovi je treba običajno določiti za vsako posamezno stehtano ribo. Če to ni mogoče, se lahko združi vzorce ob vsakem vzorčenju, vendar združevanje omeji statistične postopke, ki se lahko uporabijo za podatke, zato je treba v preskus vključiti ustrezno število rib, da bodo izpolnjeni pogoji za želeno združevanje, statistični postopek in moč. Vira (27) in (28) se lahko uporabita kot uvod v ustrezne postopke združevanja.

BKF je treba izraziti kot normaliziranega na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov (na podlagi mokre teže) poleg tega, ki se izpelje neposredno iz študije (prim. odstavek 21), razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih. Vsebnost lipidov v ribi je treba določiti ob vsakem vzorčenju, če je to mogoče, po možnosti na istem ekstraktu, kot je ta, ki je bila pridobljen za analizo preskusne snovi, saj je treba lipide pogosto odstraniti iz ekstrakta, preden ga je mogoče analizirati s kromatografijo. Vendar analiza preskusnih snovi pogosto zahteva določene postopke ekstrakcije, ki so lahko v nasprotju s preskusnimi metodami za določanje lipidov. V tem primeru (dokler ni na voljo ustreznih nedestruktivnih instrumentalnih metod) je priporočeno, da se uporabi drugačna strategija za določanje vsebnosti lipidov v ribah (prim. odstavek 56). Za določanje vsebnosti lipidov je treba uporabiti ustrezne metode (20). Kot standardna metoda (30) se lahko priporoča tehnika ekstrakcije z mešanico kloroform-metanol (29), kot druga možnost pa se priporoča Smedesova metoda (31). Značilnosti slednje metode so primerljiva učinkovitost ekstrakcije, visoka točnost, uporaba manj toksičnih organskih topil in preprosta izvedba. Uporabijo se lahko druge metode, če je njihova točnost primerljiva s to iz priporočenih metod in so ustrezno utemeljene. Pomembno je navesti podrobnosti o uporabljeni metodi.

Meritve rasti rib

Na začetku preskusa je treba stehtati od pet do deset posameznih rib iz populacije staleža in izmeriti njihovo skupno dolžino. To so lahko iste ribe, ki se uporabijo za analizo lipidov (prim. odstavek 56). Težo in dolžino rib, ki bodo uporabljene za vsako vzorčenje iz preskusne in kontrolne skupine, je treba izmeriti pred izvedbo analize kemikalij ali lipidov. Meritve teh vzorčenih rib se lahko uporabijo za oceno teže in dolžine preostalih rib v preskusnem in kontrolnem bazenu (prim. odstavek 45).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Krivuljo absorpcije preskusne snovi je treba pridobiti tako, da se njena koncentracija v/na ribi (ali določenih tkivih) v fazi absorpcije grafično prikaže v odvisnosti od časa na aritmetični lestvici. Če krivulja doseže stacionarno stanje, torej če postane približno asimptotična na časovno premico, se stacionarni BKF (BKF_{SS}) izračuna na podlagi enačbe:

$$\frac{C_f \text{stacionarno stanje}(povpr.)}{C_w \text{stacionarno stanje}(povpr.)}$$

▼M7

Rast rib lahko vpliva na potek C_f (prim. odstavka 72 in 73). Povprečna koncentracija izpostavljenosti (C_w) se spreminja s časom. Pričakuje se lahko, da je tehtano povprečje koncentracije v določenem časovnem intervalu ustreznejše in natančnejše za bioakumulacijske študije, tudi če so spremembe v ustreznem območju veljavnosti (prim. odstavek 24). Tehtano povprečje koncentracije vode v določenem časovnem intervalu (TWA, time weighted average) se lahko izračuna z enačbami iz Dodatka 5, oddelek 1.

Kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K) se določi kot razmerje k_1/k_2 med dvema konstantama hitrosti kinetike prvega reda. Konstanti hitrosti k_1 in k_2 ter BKF_K se lahko izpeljejo s hkratnim prilagajanjem faz absorpcije in očiščenja. Konstanti k_1 in k_2 pa se lahko določita tudi zaporedno (glej Dodatek 5 za opis in primerjavo teh metod). Konstanto hitrosti očiščenja (k_2) je morda treba prilagoditi glede na razredčitev zaradi rasti (prim. odstavka 72 in 73). Če krivulja absorpcije in/ali očiščenja očitno ni krivulja prvega reda, je treba uporabiti kompleksnejše modele (glej vire v Dodatku 5) ter poiskati nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika.

Podatki o teži/dolžini rib

Mokra teža in skupna dolžina posameznih rib za vsa vzorčenja se predstavita v preglednici ločeno za preskusno in kontrolno skupino med fazo absorpcije (vključno s populacijo staleža na začetku absorpcije) in očiščenja. Za vsako posamezno ribo je treba izmerjeno težo in dolžino povezati z analizirano koncentracijo kemikalije, na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo. Po možnosti se teža uporabi kot merilo za rast za namene popravljanja vrednosti kinetičnega BKF glede na razredčitev zaradi rasti (glej odstavek 73 in Dodatek 5 za metodo, ki se uporabi za popravljanje podatkov glede na razredčitev zaradi rasti).

Popravki glede na razredčitev zaradi rasti in normalizacija lipidov

Rast rib med fazo očiščenja lahko zniža izmerjene koncentracije kemikalije v ribah, kar pomeni, da je skupna konstanta hitrosti očiščenja (k_2) višja, kot pa bi bila samo na podlagi procesov odstranjevanja (npr. dihanje, metabolizem, izločanje). Kinetične biokoncentracijske faktorje je treba popraviti glede na razredčitev zaradi rasti. Rast vpliva tudi na BKF_{SS}, toda na voljo ni nobenega dogovorjenega postopka za popravljanje BKF_{SS} glede na rast. V primerih precejšnje rasti je treba izpeljati tudi BKF_K, popravljen glede na rast (BKF_{Kg}), saj je morda ustreznejše merilo biokoncentracijskega faktorja. Vsebnost lipidov v preskusnih ribah (ki so tesno povezani z bioakumulacijo hidrofobnih snovi) je lahko v praksi dovolj različna, da jo je treba normalizirati na vnaprej določeno vsebnost lipidov v ribah (5 %, masni delež), da se smiselno predstavita kinetični in stacionarni biokoncentracijski faktor, razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih (npr. nekatere perfluorirane snovi se lahko vežejo na proteine). Enačbe in primeri teh izračunov so opisani v Dodatku 5.

Da se popravi kinetični BKF glede na razredčitev zaradi rasti, je treba popraviti konstanto hitrosti očiščenja glede na rast. Ta konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}), se izračuna z odštevanjem konstante hitrosti rasti (k_g, pridobljene iz izmerjenih podatkov o teži) od skupne konstante hitrosti očiščenja (k_2). Kinetični biokoncentracijski faktor, popravljen glede na rast, se nato izračuna tako, da se konstanta hitrosti absorpcije (k_1) deli s konstanto hitrosti očiščenja, popravljeno glede na rast (k_{2g}) (prim. Dodatek 5). V nekaterih primerih ta pristop ni zanesljiv. Na primer za snovi, ki se očistijo zelo počasi in se preskušajo v hitro rastočih ribah, je lahko izpeljana konstanta k_{2g} zelo nizka, zato postanejo napake v dveh konstantah hitrosti, iz katerih se izpelje, ključnega pomena, v nekaterih primerih pa so lahko ocene kg višje kot k_2. Drug pristop,

▼M7

ki ne zahteva popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti, pa zajema uporabo mase preskusne snovi na podatke o očiščenju za ribo (celo ribo) in ne običajne mase preskusne snovi na masno enoto podatkov o (koncentraciji v) ribi. Ta pristop je preprost, saj bi v preskusih, skladnih s to preskusno metodo, zabeležene koncentracije v tkivih morale biti povezane s težo posameznih rib. Preprost postopek za ta pristop je opisan v Dodatku 5. Opozoriti je treba, da je v poročilu še vedno treba navesti k_2, čeprav je uporabljen drugi pristop.

Navesti je treba tudi kinetični in stacionarni biokoncentracijski faktor glede na privzeto vsebnost lipidov v ribah, ki znaša 5 % (masni delež), razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih. Podatki o koncentraciji v ribah ali BKF se normalizirajo glede na razmerje med 5-odstotno in dejansko (posamezno) povprečno vsebnostjo lipidov (v % mokre teže) (prim. Dodatek 5).

Če so bile analize kemikalije in lipidov izvedene na isti ribi, je treba uporabiti normalizirane podatke o lipidih v posamezni ribi za izračun BKF, ki je normaliziran glede na vsebnost lipidov. Če pa je rast v kontrolnih in izpostavljenih ribah podobna, se lahko za popravljanje vsebnosti lipidov uporabi samo vsebnost lipidov v kontrolnih ribah (prim. odstavek 56). Metoda za izračun BKF, normaliziranega glede na vsebnost lipidov, je opisana v Dodatku 5.

Razlaga rezultatov

Rezultate je treba razlagati previdno, kadar so izmerjene koncentracije preskusnih raztopin na ravneh, ki so blizu meje zaznavnosti analitske metode.

Povprečna rast v preskusni in kontrolni skupini načeloma ne bi smela biti bistveno drugačna, da se lahko izključijo toksični učinki. Konstanti hitrosti rasti ali krivulji rasti obeh skupin je treba primerjati z ustreznim postopkom ([1])).

Jasno določeni krivulji absorpcije in očiščenja kažeta na kakovostne podatke o biokoncentraciji. Za konstanti rasti bi moral rezultat preskusa prileganja χ^2 pokazati dobro prileganje (tj. majhen odstotek napak pri meritvah (32)) za bioakumulacijski model, zato da se lahko konstanti hitrosti obravnavata kot zanesljivi (prim. Dodatek 5). Če se uporabi več preskusnih koncentracij, morajo spremembe v konstantah absorpcije/očiščenja med preskusnimi koncentracijami znašati manj kot 20 % ([2]). V nasprotnem primeru to morda kaže na odvisnost od koncentracije. Zabeležiti je treba ugotovljene znatne razlike v konstantah hitrosti absorpcije/očiščenja med uporabljenima preskusnima koncentracijama in zagotoviti možna pojasnila. Na splošno se 95-odstotna meja zaupanja BKF iz dobro načrtovanih študij približa ± 20 % izpeljanega BKF.

Če se preskusita dve ali več koncentracij, se uporabijo rezultati obeh ali vseh koncentracij, da se prouči, ali so rezultati dosledni, in pokaže, ali obstaja odvisnost

([1]) Izvede se lahko *t*-test na konstantah hitrosti rasti, da se preskusi, ali je rast v kontrolni in preskusni skupini različna, ali *F*-test v primeru analize variance. *F*-test ali preskus razmerja verjetnosti se lahko po potrebi uporabi za pomoč pri izbiri ustreznega modela rasti (monografija OECD 54, (32)).

([2]) Na osnovi teh odstotkov se predvideva, da so analitske metode zanesljive in da je razpolovna doba < 14 dni. Če so analitske metode manj zanesljive ali je razpolovna doba (zelo) povečana, bodo te številke višje.

▼M7

od koncentracije. Če se preskusi samo ena koncentracija, da se zmanjša uporaba živali in/ali virov, je treba utemeljiti uporabo ene koncentracije.

Dobljeni BKF_{SS} je nezanesljiv, če je BKF_K znatno višji od BKF_{SS}, saj to morda kaže na to, da stacionarno stanje ni bilo doseženo ali da nista bila upoštevana postopek razredčitve zaradi rasti in postopek izgube. V primerih, ko je BKF_{SS} veliko višji od BKF_K, je treba preveriti, ali izpeljava konstant hitrosti absorpcije in očiščenja vsebuje napake ter jo ponovno ovrednotiti. Oceno BKF_K je morda mogoče izboljšati z drugačnim postopkom prilagajanja (prim. Dodatek 5).

Poročilo o preskusu

Poleg informacij o preskusni snovi iz odstavka 3 se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

Preskusna snov:

agregatno stanje in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je ustrezno);

— za snovi z več sestavinami in UVCB (kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali) čim boljši opis kemijske identitete posameznih sestavin in odstotek skupne mase snovi za vsako sestavino. Povzeti je treba, kako analitska metoda, uporabljena v preskusu, predstavlja merilo koncentracije snovi; opisati je treba vse analitske postopke, vključno s točnostjo metode, mejo zaznavnosti metode in mejo določljivosti.

— če gre za izotopsko označeno snov, točen položaj označenih atomov in odstotek radioaktivnosti, povezane z nečistočami;

— informacije o toksičnosti preskusne snovi za ribe (načeloma za preskusno vrsto). Toksičnost se mora navesti kot akutni 96-urni LC_{50} ter koncentracija brez opaženega škodljivega učinka (NOAEC) in najnižja koncentracija z opaženim škodljivim učinkom (LOAEC) iz študije kroničnosti (tj. preskus v zgodnjem življenjskem obdobju ali preskus celotnega življenjskega cikla, če je na voljo);

— pogoji shranjevanja preskusne kemikalije ali preskusne snovi in obstojnost preskusne kemikalije ali preskusne snovi pod pogoji shranjevanja, če je bila pred uporabo shranjena.

Preskusna vrsta:

znanstveno ime, sev, vir, morebitna predhodna obdelava, aklimatizacija, starost, spol (če je pomembno), razpon velikosti (teža in dolžina) itd.

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (npr. pretočni ali polstatični); standardna študija ali minimiziran načrt (vključno z razlogi in utemeljitvijo);

— vrsta in značilnosti uporabljene svetlobe in obdobja osvetljenosti;

— načrt preskusa (npr. število in velikost preskusnih komor, hitrost nadomestitve vodne prostornine, stopnja obremenitve, število ponovljenih vzorcev, število rib na ponovljen vzorec, število preskusnih koncentracij, dolžina faze absorpcije in očiščenja, pogostost vzorčenja ribjih in vodnih vzorcev);

▼M7

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (kadar se uporabi, je treba navesti topilo ter njegovo koncentracijo in prispevek k vsebnosti organskega ogljika v preskusni vodi) ali opis drugačnega sistema odmerjanja;

— nominalne preskusne koncentracije, povprečja izmerjenih vrednosti in njihovih standardnih odklonov v preskusnih posodah ter metoda in pogostost, s katerima so bili izmerjeni;

— vir vode za redčenje, opis morebitne predhodne obdelave, rezultati vseh dokazovanj sposobnosti preskusnih rib, da živijo v vodi, in značilnosti vode: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, skupni preostali klor (če je bil izmerjen), skupni organski ogljik, suspendirane trdne snovi, slanost preskusnega medija (če je ustrezno) in vse druge opravljene meritve;

— kakovost vode v preskusnih posodah, pH, trdota, TOC, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika; uporabljene metode in pogostost meritev;

— podrobni podatki o hranjenju, na primer vrsta hrane, vir, sestava (vsaj vsebnost lipidov in proteinov, če je mogoče), izbrana stopnja hranjenja, količina dane hrane in pogostost;

— podatki o tretiranju ribjih in vodnih vzorcev, vključno s podrobnostmi o pripravi, shranjevanju, ekstrakciji ter analitskih postopkih (in natančnost) za preskusno snov in vsebnost lipidov;

— metode, uporabljene za naključno razporeditev tretiranja in dodelitev rib v preskusne posode;

— datum dodajanja preskusnih organizmov v preskusne raztopine in trajanje preskusa;

— opis preskusa in rezultatov za določanje območja, če so na voljo.

Rezultati:

— rezultati vseh izvedenih predhodnih študij;

— smrtnost kontrolnih rib in rib v vsaki komori s preskusno snovjo ter kakršno koli ugotovljeno nenavadno vedenje;

— informacije o morebitnih ugotovljenih neželenih učinkih;

— popoln opis vseh uporabljenih postopkov kemijske analize, vključno z mejo zaznavnosti in določljivosti, variabilnostjo in izkoristkom;

— vsebnost lipidov v ribah, vključno z uporabljeno metodo, in, če je bil izpeljan, faktor normalizacije lipidov (L_n, faktor za izražanje rezultatov glede na 5-odstotno vsebnost lipidov ribah);

— v preglednici predstavljeni podatki o teži (in dolžini) rib, povezani s koncentracijami kemikalije (in vsebnostjo lipidov, kadar je ustrezno) v posameznih ribah za kontrolno in preskusno skupino (na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo), ter izračuni za izpeljane konstante hitrosti rasti;

▼M7

— v preglednici predstavljeni podatki o koncentraciji preskusne snovi v ribah (C_f, povezani s posameznimi ribami) in vodi (C_w) (s povprečnimi vrednostmi za preskusno in kontrolno skupino, standardnim odklonom in območjem, kadar je ustrezno) za vsa vzorčenja (C_f, izražen v mg/kg mokre teže celega telesa ali določenih tkiv tega telesa, npr. lipidi, in C_w v mg/l). Vrednosti C_w za kontrolno serijo (navesti je treba tudi ozadje);

— krivulje (vključno z vsemi izmerjenimi podatki), ki kažejo naslednje (če je ustrezno, se lahko koncentracije izrazijo glede na celo telo in vsebnost lipidov, normalizirano na 5 % v živali ali določenih tkivih te živali):

  — rast, tj. teža ribe v odvisnosti od časa ali teža v odvisnosti od časa, pretvorjena v naravni logaritem (vključno z izpeljano konstanto hitrosti rasti, k_g);

  — absorpcija in očiščenje preskusne snovi v ribi (na enem grafu);

  — čas, v katerem je bilo doseženo stacionarno stanje (če je bilo doseženo);

  — koncentracija v odvisnosti od časa absorpcije, pretvorjena v naravni logaritem (vključno z izpeljano konstanto hitrosti absorpcije, k_1);

  — koncentracija, pretvorjena v naravni logaritem (koncentracija ln), v odvisnosti od časa očiščenja (vključno z izpeljano konstanto hitrosti očiščenja, k_2) in

  — krivulji faz absorpcije in očiščenja, ki prikazujeta podatke in prilagojen model;

— če vizualni pregled grafičnega prikaza pokaže očitne osamelce, se lahko uporabi statistično veljaven preskus osamelcev, da se odstranijo napačne podatkovne točke in zagotovi utemeljitev za njihovo opustitev;

— stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}), če je (skoraj) doseženo stacionarno stanje;

— kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K) ter izpeljani konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja, k_1 in k_2, skupaj z variancami k_2 (naklon in osni odsek), če se uporabi zaporedno prilagajanje;

— meje zaupanja, standardni odklon (kot je na voljo) in metode za izračune/analizo podatkov za vsak parameter za vsako koncentracijo uporabljene preskusne snovi;

  — kakršne koli informacije o metabolitih izotopsko označene preskusne snovi in njihovem kopičenju;

  — konstante hitrosti rasti (vključno s 95-odstotnimi intervali zaupanja) in izračunana konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}), ter vrednosti razpolovne dobe in BKF (BKF_{Kg});

  — kar koli nenavadnega v zvezi s preskusom, kakršno koli odstopanje od teh postopkov in vsi drugi pomembni podatki;

  — preglednica s povzetimi, ustreznimi, izmerjenimi in izračunanimi podatki, kot sledi v nadaljevanju:

▼M7

Konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja snovi ter biokoncentracijski faktorji (BKF)	
k_g (konstanta hitrosti rasti; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
k_1 (skupna konstanta hitrosti absorpcije; l kg^{-1} dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
k_2 (skupna konstanta hitrosti očiščenja; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
k_{2g} (konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
C_f (koncentracija kemikalije v ribi v stacionarnem stanju; mg kg^{-1}):	vstavi vrednost ± SD ([2])
C_w (koncentracija kemikalije v vodi; mg l^{-1}):	vstavi vrednost ± SD ([2])
L_n (faktor normalizacije lipidov):	vstavi vrednost ([3])
BKF_{SS} (stacionarni BKF; l kg^{-1})	vstavi vrednost ± SD ([2])
BKF_{SSL} (stacionarni BKF, normaliziran glede na lipide; l kg^{-1}):	vstavi vrednost ([3]) ± SD ([2])
BKF_K (kinetični BKF; l kg^{-1})	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
BKF_{Kg} (kinetični BKF, popravljen glede na rast; l kg^{-1})	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
$t_{1/2g}$ (razpolovna doba, popravljena glede na rast; dan):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) ([1])
BKF_{KL} (kinetični BKF, normaliziran glede na vsebnost lipidov; l kg^{-1}):	vstavi vrednost
BKF_{KLG} (kinetični BKF, popravljen glede na rast in normaliziran glede na vsebnost lipidov; l kg^{-1}):	vstavi vrednost

([1]) CI (confidence interval): interval zaupanja (kadar ga je mogoče oceniti)
([2]) SD (standard deviation): standardni odklon (kadar ga je mogoče oceniti)

Preprečiti je treba rezultate, ki so v poročilu navedeni kot „ni zaznano/količinsko opredeljeno na meji zaznavnosti/določljivosti“ pri razvoju metode in načrta preskusa pred preskusom, saj takih rezultatov ni mogoče uporabiti za izračune konstant hitrosti.

C.13 – II: **Minimiziran preskus vodne izpostavljenosti rib**

UVOD

Vedno več izkušenj, ki so jih laboratoriji in regulativni organi pridobili z izvedbo in razlago popolnega preskusa, kaže, da se za oceno konstant hitrosti absorpcije in očiščenja uporablja kinetika prvega reda, razen za nekatere izjeme. Zato se lahko konstanti hitrosti absorpcije in očiščenja ocenita s čim manjšim številom točk vzorčenja ter izpelje kinetični BKF.

Proučevanje drugačnih načrtov za študije BKF je bilo najprej namenjeno razvoju kratkega preskusa, ki bi bil uporabljen kot vmesni korak preskušanja, da se potrdi ali ovrže ocene BKF na podlagi K_{OW} in QSAR, s tem pa odpravi potreba po

▼M7

popolni študiji za mnoge snovi ter zmanjša stroške in uporabo živali z zmanjšanim vzorčenjem in številom izvedenih analitskih zaporedij. Ob upoštevanju glavnega načrta prejšnje preskusne metode, da se zagotovi združevanje rezultatov preskusa z obstoječimi podatki o BKF ter olajša izvedba preskusov in razlaga podatkov, je bil cilj zagotoviti ocene BKF z ustrezno točnostjo in natančnostjo za sprejemanje odločitev v zvezi z oceno tveganja. Uporabljajo se mnoga ista načela kot pri popolnem preskusu, npr. merila za veljavnost (prim. odstavek 24) in prekinitev preskusa, če se ob koncu faze absorpcije ugotovi zanemarljiva absorpcija (prim. odstavka 16 in 38).

Snovi, za katere se lahko izvede minimiziran načrt preskusa, morajo soditi v splošno območje, za katerega je bila razvita ta preskusna metoda, tj. nepolarne organske snovi (prim. odstavek 49). Če kar koli kaže na to, da bi se lahko snov, ki se bo preskusila, vedla drugače (npr. očitno odstopanje od kinetike prvega reda), je treba zaradi regulativnih razlogov izvesti popoln preskus.

Minimiziran preskus se običajno ne izvaja v krajšem časovnem obdobju kot standardni preskus BKF, ampak zajema manj vzorčenj rib (glej Dodatek 6 za utemeljitev). Lahko pa se skrajša faza očiščenja za snovi, ki se zelo hitro očistijo, da se prepreči padec koncentracij v ribah pod mejo zaznavnosti/določljivosti pred koncem preskusa. Minimiziran preskus izpostavljenosti rib z eno koncentracijo se lahko uporabi za opredeljevanje potrebe po popolnem preskusu in če so rezultati preskusa, uporabljeni za izračun konstant hitrosti in BKF, zanesljivi (prim. odstavek 93), se lahko opusti izvedba popolnega preskusa, če dobljeni BKF očitno ne sodi v območje vrednosti, ki zahtevajo regulativni nadzor.

V nekaterih primerih je morda bolje izvesti minimiziran načrt preskusa z več preskusnimi koncentracijami kot predhodni preskus, da se določi, ali so ocene BKF za snov odvisne od koncentracije. Če ocene BKF iz minimiziranega preskusa kažejo na odvisnost od koncentracije, je treba izvesti popoln preskus. Če na podlagi takega minimiziranega preskusa ocene BKF niso odvisne od koncentracije, ampak se rezultati ne morejo obravnavati kot dokončni, potem se lahko kateri koli nadaljnji popolni preskus izvede z eno koncentracijo, s tem pa se zmanjša uporaba živali v primerjavi s popolnim preskusom z dvema koncentracijama (ali več).

Snovi, za katere se lahko morebiti izvede minimiziran preskus, morajo:

— najverjetneje slediti približni kinetiki absorpcije in očiščenja prvega reda, npr. na podlagi virov o podobnih snoveh;

— imeti log K_{OW} < 6, razen če se pričakuje zelo hiter metabolizem ([1]);

— biti dovolj topne v vodi glede na analitsko tehniko (prim. odstavek 24);

— biti jasno količinsko opredeljive (tj. koncentracije morajo biti vsaj en red velikosti nad mejo določljivosti) v ribah in vodi, priporočeno je označevanje radioaktivnosti (prim. odstavek 23); in

— imeti daljšo fazo očiščenja kot je njihova predvidena razpolovna doba (prim. Dodatek 5 za izračune) ali pa je treba ustrezno prilagoditi trajanje očiščenja (prim. odstavek 91). Izjema k temu pravilu je dovoljena, če se pričakuje zelo hiter metabolizem snovi.

([1]) Minimiziran preskus se lahko pravzaprav uporabi, da se dokaže zelo hiter metabolizem, kadar se ve, da je to najverjetneje značilno za snov.

▼M7

ČASOVNI RAZPORED VZORČENJA ZA ŠTUDIJE, KI SLEDIJO MINIMIZIRANEMU NAČRTU

Vzorčenje rib

Vzorčenje rib je zmanjšano na štiri točke vzorčenja:

— na sredini in ob koncu faze absorpcije (slednja je hkrati začetek očiščenja), npr. po 14 in 28 dneh (33);

— na sredini faze očiščenja in ob koncu študije (ko je koncentracija snovi < 10 % največje koncentracije ali vsaj očitno po eni razpolovni dobi snovi), npr. po 7 in 14 dneh očiščenja (33). Če se pričakuje ali ugotovi zelo hitro očiščenje, je morda treba skrajšati fazo očiščenja, da se prepreči padec koncentracij v ribah pod mejo določljivosti;

— merjenje lipidov kot v popolni študiji;

— popravljanje zaradi rasti kot v popolni študiji;

— BKF se izračuna kot kinetični BKF.

Vzorčenje vode

Pri minimiziranem načrtu se voda vzorči kot v popolni študiji (prim. odstavek 54) ali vsaj petkrat, ta vzorčenja pa so enakomerno porazdeljena v fazi absorpcije, in enkrat tedensko v fazi očiščenja.

Spremembe načrta

Ob upoštevanju lastnosti preskusne snovi, veljavnih napovedi QSAR in določenega namena študije se lahko obravnavajo nekatere spremembe načrta študije:

— če je potrebna večja natančnost, se lahko za vzorec ob koncu faze absorpcije uporabi več rib (6 ali 8 namesto 4);

— Če očiščenje v 14 dneh (ali ob predvidenem koncu faze očiščenja) ni bilo dovolj za ustrezno očiščenje (tj. > 50 %), se lahko uporabi „dodatna“ skupina rib. Če je predvideno trajanje faze očiščenja krajše ali daljše od 14 dni, je treba prilagoditi časovni razpored vzorčenja (tj. ena skupina rib ob predvidenem koncu faze očiščenja in ena skupina na polovici te faze);

— uporaba dveh preskusnih koncentracij, da se prouči morebitna odvisnost od koncentracije. Če rezultati minimiziranega preskusa, izvedenega z dvema preskusnima koncentracijama, kažejo, da BKF ni odvisen od koncentracije (tj. razlika je manj kot 20-odstotna), se lahko ena preskusna koncentracija obravnava kot zadostna v popolnem preskusu, če bo izveden;

— za pomoč pri načrtovanju dolžine faz absorpcije in očiščenja se lahko najverjetneje uporabijo modeli bioakumulacijskih postopkov, na primer ti, ki so predlagani v Arnot idr. (35) (glej tudi Dodatek 5).

Izračuni

Razlog za ta pristop je, da se lahko biokoncentracijski faktor v popolnem preskusu določi kot stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}), tako da se izračuna razmerje med koncentracijo preskusne snovi v ribjem tkivu in koncentracijo preskusne snovi v vodi, ali z izračunom kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_K), ki je razmerje med konstanto hitrosti absorpcije k_1 in konstanto hitrosti očiščenja k_2. BKF_K je veljaven, čeprav med absorpcijo ni dosežena stacionarna koncentracija snovi, če absorpcija in očiščenje približno sledita kinetičnim procesom prvega reda. Za oceno konstant hitrosti absorpcije in očiščenja

▼M7

sta potrebni najmanj dve podatkovni točki, ena ob koncu faze absorpcije (tj. na začetku faze očiščenja) in ena ob koncu faze očiščenja (ali po večjem delu te faze). Priporočena je vmesna točka vzorčenja za preverjanje kinetike absorpcije in očiščenja ([1]). Za izračune glej Dodatka 5 in 6.

Razlaga rezultatov

Za oceno veljavnosti in informativnosti preskusa je treba preveriti, da faza očiščenja presega eno razpolovno dobo snovi. Poleg tega je BKF_{Km} (kinetični BKF, izpeljan iz minimiziranega preskusa) treba primerjati z minimizirano vrednostjo BKF_{SS} (tj. BKF_{SS}, izračunan ob koncu faze absorpcije na podlagi predvidevanja, da je bilo doseženo stacionarno stanje. To je mogoče zgolj predvidevati, saj število točk vzorčenja ni zadostno, da se lahko dokaže). Če je BKF_{Km} < minimiziranega BKF_{SS}, mora biti minimizirani BKF_{SS} preferenčna vrednost. Če je BKF_{Km} manjši od 70 % minimiziranega BKF_{SS}, rezultati niso veljavni in treba je izvesti popoln preskus.

Če se z minimiziranim preskusom dobi BKF_{Km} v območju kakršne koli vrednosti, ki zahteva regulativni nadzor, je treba izvesti popoln preskus. Če rezultat očitno ne sodi v območje kakršne koli vrednosti, ki zahteva regulativni nadzor (je precej nad ali pod tako vrednostjo), morda ni potrebno izvesti popolnega preskusa, ali pa se lahko izvede popoln preskus z eno koncentracijo, če to zahteva ustrezni regulativni okvir.

Če se ugotovi, da je po minimiziranem preskusu z eno koncentracijo treba izvesti popoln preskus, se lahko ta izvede s še eno koncentracijo. Če so rezultati dosledni, se lahko opusti nadaljnji popolni preskus z drugačno koncentracijo, saj se za biokoncentracijo snovi predvideva, da ni odvisna od koncentracije. Če je bil izveden minimiziran preskus z dvema koncentracijama in rezultati kažejo na neodvisnost od koncentracije, se lahko popoln preskus izvede samo z eno koncentracijo (prim. odstavek 87).

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu za minimizirani preskus morajo biti vključene vse informacije, ki so zahtevane za popoln preskus (prim. odstavek 81), razen tistih, ki jih ni mogoče natančno pojasniti (tj. krivulja, ki kaže čas za doseganje stacionarnega stanja in stacionarni biokoncentracijski faktor; namesto slednjega je treba navesti minimizirani BKF_{ss}). Poleg tega mora zajeti razloge za uporabo minimiziranega preskusa in dobljenega BKF_{Km}.

C.13 – III: **Preskus prehranske izpostavljenosti za ugotavljanje bioakumulacije v ribah**

UVOD

Metodo, opisano v tem oddelku, je treba uporabljati za snovi, pri katerih izvedba metodologije vodne izpostavljenosti ni praktična (na primer zato, ker ni mogoče ohranjati obstojnih, merljivih koncentracij v vodi ali ker ni mogoče doseči ustreznih obremenitev telesa v 60 dneh izpostavljenosti; glej prejšnje oddelke o metodi vodne izpostavljenosti). Vendar se je treba zavedati, da je končna točka tega preskusa prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF) in ne biokoncentracijski faktor (BKF) ([2]).

Maja 2001 je bila na konferenci SETAC Europe v Madridu predstavljena nova metoda za preskušanje bioakumulacije organskih snovi, slabo topnih v vodi (36). To delo temelji na različnih objavljenih bioakumulacijskih študijah v virih, ki uporabljajo metodo odmerjanja na podlagi hrane z dodatkom (*npr*. (37)). Na začetku leta 2004 je bil delovni skupini PBT EU skupaj s podpornim referenčnim dokumentom (39) predložen osnutek protokola (38), zasnovan za merjenje bioakumulacijskega potenciala organskih snovi, slabo topnih v vodi, pri katerih

([1]) Kadar se merita samo dve podatkovni točki, se lahko ocene meje zaupanja za BKF_{Km} izvedejo z metodami samovzorčenja. Ko so na voljo tudi vmesne podatkovne točke, se lahko meje zaupanja za BKF_{Km} izračunajo kot v popolnem preskusu.

([2]) Za opredelitev pojmov in enote glej Dodatek 1.

▼M7

izvedba standardne metode vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije ni bila praktična. Nadaljnja utemeljitev za metodo je bila, da lahko do morebitne izpostavljenosti v okolju takim, slabo topnim snovem (tj. log K_{OW} > 5) pride predvsem s prehrano (*prim*. (40), (41), (42), (43) in (44)). Zato so v nekaterih objavljenih uredbah o kemikalijah navedeni preskusi prehranske izpostavljenosti ([1]). Vendar je treba vedeti, da je bila v metodi, opisani v tem dokumentu, izpostavljenost prek vodne faze previdno izpuščena, zato vrednosti BMF iz te preskusne metode ni mogoče neposredno primerjati z vrednostjo BMF iz terenske študije (v kateri sta morda združeni vodna in prehranska izpostavljenost).

Ta del trenutne preskusne metode temelji na tem protokolu (38) in je nova metoda, ki se ni pojavila v predhodni različici TM C.13. Ta drugačni preskus omogoča neposredno proučevanje poteka prehranske izpostavljenosti pod nadzorovanimi laboratorijskimi pogoji.

Morebitni raziskovalci si morajo prebrati odstavke od 1 do 14 te preskusne metode za informacije o tem, kdaj je bolje izvesti preskus prehranske izpostavljenosti kot pa preskus vodne izpostavljenosti. Navedene so informacije o različnih vidikih snovi, ki jih je treba upoštevati pred izvedbo preskusa.

Obravnava se lahko uporaba izotopsko označenih preskusnih snovi, pri tem pa je treba upoštevati podobne vidike kot pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavka 6 in 65).

Prehranska metoda se lahko uporabi za preskušanje več snovi v enem preskusu, če so izpolnjena določena merila, ki so nadalje obravnavana v odstavku 112. Zaradi preprostosti ta metodologija opisuje preskus s samo eno preskusno snovjo.

Prehranski preskus je v mnogih vidikih podoben metodi vodne izpostavljenosti, pri čemer je očitna izjema način izpostavljenosti. Zato se mnogo vidikov metode, opisane v tem dokumentu, prekriva z metodo vodne izpostavljenosti, ki je opisana v prejšnjem oddelku. Uporabljenih je bilo čim več sklicevanj na ustrezne odstavke v prejšnjem oddelku, vendar se določenim podvojitvam ni bilo mogoče izogniti zaradi boljše berljivosti in razumevanja.

NAČELO PRESKUSA

Uporabiti je mogoče pretočne ali polstatične pogoje (prim. odstavek 4), priporočeni pa so pretočni pogoji, da se omeji morebitna izpostavljenost preskusne snovi prek vode zaradi kakršne koli desorpcije iz hrane z dodatkom ali iz iztrebkov. Preskus zajema dve fazi: absorpcija (hrana z dodatkom preskusne snovi) in očiščenje (čista, netretirana hrana) (prim. odstavek 16). V fazi absorpcije se „preskusna“ skupina rib vsak dan hrani z vnaprej določeno prehrano iz ribje hrane, dostopne na trgu, z znano sestavo, ki ji je dodana preskusna snov. Ribe bi načeloma morale pojesti vso hrano, ki jim je dana (*prim.* odstavek 141). Nato pa se ribe hranijo s čisto, netretirano ribjo hrano, dostopno na trgu, v fazi očiščenja. Pri metodi vodne izpostavljenosti se lahko po potrebi uporabi več preskusnih skupin z različnimi koncentracijami preskusne snovi z dodatkom, čeprav je za večino močno hidrofobnih, organskih preskusnih snovi dovolj ena preskusna skupina (prim. odstavka 49 in 107). Če se uporabijo polstatični pogoji, je treba ribe prenesti v nov medij in/ali novo preskusno komoro ob koncu faze absorpcije (v primeru, da sta bila medij in/ali oprema, uporabljena v fazi absorpcije, onesnažena s preskusno snovjo zaradi luženja). Koncentracije preskusne snovi v ribah se merijo v obeh fazah preskusa. Poleg skupine rib, ki se hranijo

([1]) Za namene Uredbe (ES) št. 1907/2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) (UL L 396, 30.12.2006, str. 1) je to vprašanje obravnavano v „Smernicah za zahteve po informacijah in oceno kemijske varnosti“, poglavja R.7c, R.7.10.3.1 in R.7.10.4.1 ter slika R7.10–2.

▼M7

s hrano z dodatkom (preskusna skupina), se kontrolna skupina rib goji pod enakimi pogoji in hrani enako, razen da ribji hrani, dostopni na trgu, ni dodana preskusna snov. Ta kontrolna skupina omogoča, da se količinsko opredelijo ravni ozadja preskusne snovi v neizpostavljenih ribah, in se uporablja za primerjavo v zvezi s kakršnimi koli neželenimi učinki, povezanimi z tretiranjem in opaženimi v preskusnih skupinah ([1]). Omogoča tudi primerjavo konstant hitrosti rasti med skupinami, da se lahko preveri, ali so ribe pojedle podobno količino ponujene hrane (pri pojasnjevanju različnih konstant hitrosti rasti je treba obravnavati tudi morebitne razlike v okusnosti med hranama; prim. odstavek 138). Pomembno je, da se med fazo absorpcije in očiščenja preskusni in kontrolni skupini daje hrano z enako hranilno vrednostjo.

Na podlagi izkušenj raziskovalcev, ki so razvili metodo, je običajno dovolj, da faza absorpcije traja 7–14 dni (38), (39). To obdobje bi moralo čim bolj zmanjšati stroške izvedbe preskusa, hkrati pa zagotoviti zadostno izpostavljenost za večino snovi. V nekaterih primerih pa se lahko faza absorpcije podaljša (prim. odstavek 127). Koncentracija snovi v ribah med fazo absorpcije morda ne bo dosegla stacionarnega stanja, zato obdelava podatkov in rezultati te metode običajno temeljijo na kinetični analizi ostankov v tkivih. (Opomba: pri tem se lahko uporabijo enačbe za oceno časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja, tako kot pri preskusu vodne izpostavljenosti – glej Dodatek 5). Faza očiščenja se začne, ko se ribam prvič da hrana brez dodatka, in običajno traja do največ 28 dni ali do takrat, ko ni mogoče več količinsko opredeliti preskusne snovi v celi ribi, kar koli od tega je prej. Faza očiščenja se lahko skrajša ali podaljša za več kot 28 dni glede na spremembe v odvisnosti od časa v izmerjenih koncentracijah kemikalij in velikosti rib.

S to metodo se lahko opredelijo razpolovna doba, ki je značilna za snov ($t_{1/2}$, iz konstante hitrosti očiščenja, k_2), učinkovitost asimilacije (absorpcija v črevesju; *a*), kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor (BMF_K), kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast (BMF_{Kg}) in kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na lipide ([2]) (BMF_{KL}) (in/ali kinetični prehranski biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast in lipide, BMF_{KgL}) za preskusno snov v ribah. Tako kot pri metodi vodne izpostavljenosti povečanje mase rib med preskusom povzroči razredčitev preskusne snovi v rastočih ribah, zato je (kinetični) BMF prenizko ocenjen, če se ga ne popravi na podlagi rasti (prim. odstavka 162 in 163). Poleg tega se lahko izračuna indikativen stacionarni BMF, če je ocenjeno, da je bilo v fazi absorpcije doseženo stacionarno stanje. Na voljo so pristopi, ki omogočajo oceno kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_K) na podlagi podatkov, pridobljenih v prehranski študiji (npr. (44), (45), (46), (47) in (48). Prednosti in slabosti takih pristopov so opisane v Dodatku 8.

([1]) Večine preskusnih snovi se načeloma ne sme zaznati v kontrolni vodi. Koncentracije ozadja bi morale biti pomembne samo za naravno prisotne materiale (npr. nekatere kovine) in snovi, ki so splošno prisotne v okolju.

([2]) Ker je BMF opredeljen kot razmerje med koncentracijo snovi v organizmu in koncentracijo snovi v hrani organizma v stacionarnem stanju, se upoštevajo lipidi tako, da se vrednost popravi glede na vsebnost lipidov v organizmu in hrani, zato ga je ustrezneje opisati kot „popravek“. Ta pristop se razlikuje od „normalizacije“ na vnaprej določeno vsebnost lipidov v organizmu, ki se izvede pri preskusu vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije.

▼M7

Preskus je bil primarno zasnovan za nepolarne organske snovi, slabo topne v vodi, ki približno sledijo kinetiki absorpcije in očiščenja prvega reda v ribah. Če se snov preskusi in ne sledi približnosti kinetiki absorpcije in očiščenja prvega reda, je treba uporabiti kompleksnejše modele (glej vire v Dodatku 5) ter poiskati nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika.

BMF se običajno določi z analizo preskusne snovi v celi ribi (na podlagi mokre teže). Če je to pomembno za cilj študije, se lahko vzorčijo določena tkiva (npr. mišice, jetra), če se riba razdeli na užitne in neužitne dele (prim. odstavek 21). Poleg tega se lahko odstrani gastrointestinalni trakt in izvede ločena analiza, da se opredeli prispevek h koncentracijam v celi ribi za točke vzorčenja ob koncu faze absorpcije in skoraj na začetku faze očiščenja, ali kot del pristopa masne bilance.

Izmeriti je treba vsebnost lipidov v celi vzorčeni ribi, zato da se lahko koncentracije popravijo glede na lipide, pri tem pa se upošteva vsebnost lipidov v hrani in ribi (prim. odstavka 56 in 57 ter Dodatek 7).

Izmeriti in zabeležiti je treba težo vzorčenih posameznih rib ter jo povezati z analizirano koncentracijo kemikalije v teh posameznih ribah (npr. z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo), zato da se lahko izračuna rast, do katere je morda prišlo med preskusom. Kadar je mogoče, je treba izmeriti tudi skupno dolžino ribe ([1]). Podatki o teži so potrebni tudi za oceno BKF, pri čemer se uporabijo podatki o očiščenju iz prehranskega preskusa.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

Na voljo morajo biti informacije o preskusni snovi, kot so opisane v odstavkih 3 in 22. Običajno ni potrebna analitska metoda za koncentracije preskusne snovi v vodi, zahtevane pa so metode z zadostno občutljivostjo za merjenje koncentracij v ribji hrani in tkivih.

Metoda se lahko uporabi za preskušanje več snovi v enem preskusu. Vendar morajo biti preskusne snovi med sabo združljive, tako da ne vplivajo druga na drugo in ne spremenijo svoje kemijske identitete, ko se jih doda v ribjo hrano. Cilj je, da se izmerjeni rezultati za vse posamezne snovi, ki so preskušene skupaj, ne razlikujejo veliko od rezultatov, ki bi se pridobili, če bi se izvedli posamezni preskusi za vsako preskusno snov. S predhodnimi analitskimi raziskavami je treba ugotoviti, da se lahko vsaka snov ponovno pridobi iz hrane z več dodatki in vzorca ribjega tkiva z i) visokim izkoristkom (npr. > 85 % nominalne vrednosti) in ii) ustrezno občutljivostjo za preskušanje. Skupni odmerek snovi, ki se preskušajo skupaj, mora biti nižji od skupne koncentracije, ki bi lahko povzročila toksične učinke (prim. odstavek 51). Poleg tega je treba pri načrtu preskusa upoštevati morebitne neželene učinke pri ribah in potencial za vzajemne učinke (npr. metabolične učinke), ki so povezani s preskušanjem več snovi hkrati. Izogniti se je treba tudi sočasnemu preskušanju snovi, ki lahko ionizirajo. V smislu izpostavljenosti je metoda primerna tudi za kompleksne zmesi (prim. odstavek 13, čeprav zanjo veljajo enake omejitve pri analizi kot za katero koli drugo metodo).

VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji (prim. odstavek 24):

— sprememba temperature vode mora znašati manj kot ± 2 °C v tretiranih in kontrolnih skupinah;

([1]) Med preskusom je treba zabeležiti tudi skupno dolžino, saj je dober pokazatelj tega, ali je prišlo do neželenega učinka.

▼M7

— koncentracija raztopljenega kisika ne sme pasti pod 60 % nasičenosti z zrakom;

— koncentracija preskusne snovi v ribji hrani pred in ob koncu faze absorpcije mora tudi biti v območju ± 20 % (na podlagi vsaj treh vzorcev v obeh časovnih točkah);

— v predhodnih analitskih raziskavah o hrani z dodatkom je treba dokazati visoko stopnjo homogenosti snovi v hrani, pri čemer vsaj tri koncentracije vzorca za snov, vzete ob začetku preskusa, ne smejo od povprečja odstopati za več kot ± 15 %;

— koncentracije preskusne snovi niso zaznane ali so prisotne samo v običajnih sledeh v hrani brez dodatka ali tkivih kontrolnih rib glede na tretirane vzorce;

— smrtnost ali drugi neželeni učinki/bolezni v kontrolni in tretirani skupini rib morajo ob koncu preskusa znašati ≤ 10 %; če se preskus zaradi kakršnega koli razloga podaljša, morajo biti neželeni učinki v obeh skupinah ≤ 5 % na mesec in ≤ 30 % skupno. Precejšnje razlike v povprečni rasti med preskusnimi in kontrolnimi skupinami vzorčenih rib so lahko pokazatelj toksičnega učinka preskusne snovi.

REFERENČNE SNOVI

Če laboratorij še ni izvedel preskusa ali je prišlo do precejšnjih sprememb (npr. sprememba seva ali dobavitelja rib, druga vrsta rib, precejšnje spremembe v velikosti rib, ribji hrani ali metodi dodajanja snovi v hrano itd.), se priporoča izvedba študije tehnične usposobljenosti z referenčno snovjo. Referenčna snov se uporablja predvsem ugotavljanje, ali je tehnika za dodajanje snovi v hrano ustrezna, da se zagotovi čim večja homogenost in biološka dostopnost preskusnih snovi. Primer, ki je bil uporabljen v primeru nepolarnih hidrofobnih snovi, je heksaklorobenzen (HCB), vendar je treba zaradi nevarne lastnosti heksaklorobenzena obravnavati druge snovi, za katere so na voljo obstoječi, zanesljivi podatki o absorpciji in biomagnifikaciji ([1]). Če se uporabi referenčna snov, je treba v poročilu o preskusu zagotoviti osnovne informacije o tej snovi, vključno z imenom, čistostjo, številko CAS, strukturo in podatki o toksičnosti (če so na voljo), tako kot za preskusne snovi (prim. odstavka 3 in 22).

OPIS METODE

Oprema

Materiali in oprema morajo biti uporabljeni tako, kot je opisano v metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 26). Uporabiti je treba pretočni preskusni sistem ali preskusni sistem za statično obnavljanje vode, ki zagotavlja zadostno prostornino vode za redčenje v preskusnih bazenih. Zabeležiti je treba hitrost pretoka.

Voda

Preskusna voda mora biti uporabljena tako, kot je opisano v metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavka 27–29). Preskusni medij je treba opredeliti, kot je opisano, in kakovost medija mora biti med preskusom konstantna. Vsebnost naravnih delcev in skupni organski ogljik (TOC) morata biti čim nižja (≤ 5 mg/l delcev; ≤ 2 mg/l skupnega organske ogljika) pred začetkom preskusa. TOC je treba izmeriti samo pred preskusom v okviru opredelitve lastnosti preskusne vodi (prim. odstavek 53).

([1]) HCB je naveden v prilogah A in C k Stockholmski konvenciji in v prilogah I in III Uredbe (ES) št. 850/2004 o obstojnih organskih onesnaževalih (UL L 158, 30.4.2004, str. 7).

▼M7

Hrana

Priporočena je ribja hrana, ki je dostopna na trgu (peleti, ki plavajo in/ali počasi potonejo na dno) in ima opredeljene vsaj vsebnost proteinov in maščob. Peleti morajo biti enake velikosti, da se poveča učinkovitost izpostavljenosti hrani, tj. ribe bodo pojedle več hrane, saj ne bodo jedle samo večjih kosov in zgrešile manjše. Na začetku preskusa je treba izbrati pelete ustrezne velikost glede na velikost rib (npr. uporabijo se lahko peleti s približnim premerom 0,6–0,85 mm za ribe s skupno dolžino od 3 do 7 cm in 0,85–1,2 mm za ribe s skupno velikostjo od 6 do 12 cm). Na začetku faze očiščenja se lahko velikost peletov prilagodi glede na rast rib. Primer ustrezne sestave hrane, ki je dostopna na trgu, je naveden v Dodatku 7. Pri razvoju te metode je bila običajno uporabljena preskusna hrana s skupno vsebnostjo lipidov od 15 do 20 % (masni delež). Na nekaterih območjih morda ni na voljo ribja hrana s tako visoko koncentracijo lipidov. V takih primerih se lahko študije primerov izvedejo z nižjo koncentracijo lipidov v hrani in po potrebi ustrezno prilagodi stopnjo hranjenja za ohranjanje zdravja rib (na podlagi predhodnega preskušanja). Pred začetkom preskusa in ob koncu faze absorpcije je treba izmeriti in zabeležiti skupno vsebnost lipidov v hrani preskusne in kontrolne skupine. V poročilu o študiji je treba predstaviti podrobnosti, ki jih je zagotovil dobavitelj hrane, dostopne na trgu, o analizi za hranila, vlago, vlaknine in pepel ter po možnosti ostanke mineralov in pesticidov (npr. „standardna“ prednostna onesnaževala).

Pri dodajanju preskusne snovi v hrano si je treba čim bolj prizadevati, da se zagotovi homogenost v celotni preskusni hrani. Koncentracijo preskusne snovi v hrani za preskusno skupino je treba izbrati ob upoštevanju občutljivosti analitske tehnike, toksičnosti preskusne snovi (NOEC, če je znan) in ustreznih fizikalno-kemijskih podatkov. Če se uporabi referenčna snov, jo je treba po možnosti vključiti pri koncentraciji, ki znaša približno 10 % koncentracije preskusne snovi (oziroma je v vsakem primeru tako nizka, kot je praktično izvedljivo), glede na občutljivost analize (npr. za heksaklorobenzen je bilo ugotovljeno, da sprejemljiva koncentracija v hrani znaša 1–100 μg/g; prim. (47) za več informacij o učinkovitosti asimilacije HCB).

Preskusna snov se lahko ribji hrani doda na več načinov glede na njene fizikalne lastnosti in topnost (glej Dodatek 7 za več podrobnosti o metodah za dodajanje snovi v hrano):

— če je snov topna in obstojna v trigliceridih, jo je treba raztopiti v majhni količini ribjega ali užitnega rastlinskega olja, preden se jo primeša ribji hrani. V tem primeru je treba skrbno zagotoviti, da pri tem ne nastane obrok s previsoko vsebnostjo lipidov, ter upoštevati vsebnost naravnih lipidov v hrani z dodatkom, tako da se doda najmanjša znana količina olja, ki je potrebna, da se doseže porazdelitev in homogenost preskusne snovi v hrani, ali;

— hrani je treba dodati preskusno snov z ustreznim organskim topilom, če to ne vpliva na homogenost in biološko dostopnost (zaradi izhlapevanja topila lahko v hrani nastanejo (mikro)kristali preskusne snovi, tega pa ni mogoče dokazati na preprosto način; prim. (49)), ali;

— neviskozne tekočine je treba dodati neposredno v ribjo hrano, vendar jih je treba dobro premešati, da se doseže homogenost in pospeši dobra asimilacija. S tehniko mešanja je treba zagotoviti homogenost hrane z dodatkom.

▼M7

V nekaterih primerih, npr. za manj hidrofobne preskusne snovi, za katere obstaja verjetnost desorpcije iz hrane, je morda treba na pripravljene pelete hrane nanesti majhno količino koruznega/ribjega olja (glej odstavek 142). V takih primerih je treba kontrolno hrano tretirati enako in zadnjo pripravljeno hrano uporabiti za merjenje vsebnosti lipidov.

Če se uporabi referenčna snov, morajo ti rezultati biti primerljivi s podatki študij iz virov, ki so bile izvedene v podobnih pogojih in s primerljivo stopnjo hranjenja (prim. odstavek 45), in parametri, značilni za referenčno snov, morajo izpolnjevati ustrezna merila iz odstavka 113 (3., 4. in 5. točka).

Če se kot vehikel za preskusno snov uporabi olje ali topilo, je treba enako količino istega vehikla (brez preskusne snovi) primešati kontrolni hrani, da je ta enaka hrani z dodatkom. Pomembno je, da se med fazo absorpcije in očiščenja preskusni in kontrolni skupini daje hrano z enako hranilno vrednostjo.

Hrano z dodatkom je treba shranjevati pod pogoji, ki ohranjajo obstojnost preskusne snovi v mešanici hrane (npr. hlajenje), in te pogoje navesti v poročilu.

Izbira vrste rib

Uporabijo se lahko ribe, ki so navedene za preskus vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 32 in Dodatek 3). Šarenka (*Oncorhynchus mykiss*), krap (*Cyprinus carpio*) in črnoglavi pisanec (*Pimephales promelas*) so bili pogosto uporabljeni v študijah prehranske bioakumulacije z organskimi snovmi pred objavo te preskusne metode. Vrsta rib se mora pri hranjenju vesti tako, da zelo hitro poje dani obrok hrane, saj se s tem čim bolj omeji kakršen koli dejavnik, ki vpliva na koncentracijo preskusne snovi v hrani (npr. luženje v vodo in možnost vodne izpostavljenosti). Uporabiti je treba ribe z velikostjo/težo v priporočenem območju (prim. Dodatek 3). Ribe ne smejo biti tako majhne, da bi njihova velikost ovirala preprostost analize posameznih rib. Ribje vrste, preskušene v fazi hitre rasti, lahko otežijo razlago podatkov, hitra rast pa lahko vpliva na izračun učinkovitosti asimilacije ([1]).

Vzdrževanje rib

Merila za sprejemljivost v zvezi z aklimatizacijo, smrtnostjo in boleznijo so enaka kot pri metodi vodne izpostavljenosti pred izvedbo preskusa (prim. odstavki 33–35).

IZVEDBA PRESKUSA

Raziskave pred študijo in preskus za določanje območja

Analitske raziskave pred študijo so potrebne, da se dokaže izkoristek snovi iz hrane z dodatkom/ribjega tkiva z dodatkom. Preskus za določanje območja, da se izbere ustrezna koncentracija v hrani, ni vedno potreben. Lahko se izvede predhodne prehranske preskuse, vendar ti niso obvezni, da se pokaže, da niso ugotovljeni nobeni neželeni učinki, da se oceni okusnost hrane z dodatkom ter občutljivost analitske metode za ribja tkiva in hrano ter da se izbere ustrezno stopnjo

([1]) Za hitro rast med fazo absorpcije se dejanska stopnja hranjenja zmanjša na nižjo od te, ki je bila določena na začetku izpostavljenosti.

▼M7

hranjenja in intervale vzorčenja med fazo očiščenja itd. Predhodna študija je lahko dragocena za oceno števila rib, ki je potrebno za vzorčenje med fazo očiščenja. To lahko pomeni precejšnje zmanjšanje števila uporabljenih rib, zlasti za preskusne snovi, ki so še posebej dojemljive za metabolizem.

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje faze absorpcije

Običajno je dovolj, da faza absorpcije traja 7–14 dni, in med tem se vsak dan ena skupina rib hrani s kontrolno hrano, druga skupina rib pa s preskusno hrano na podlagi vnaprej določenega obroka, ki je odvisen od preiskovane vrste in preskusnih pogojev, npr. med 1–2 % telesne teže (mokra teža) v primeru šarenke. Stopnjo hranjenja je treba izbrati tako, da se prepreči hitra rast in veliko povečanje vsebnosti lipidov. Faza absorpcije se lahko po potrebi podaljša glede na praktične izkušnje iz preteklih študij ali znanja o absorpciji/očiščenju preskusne (ali druge ustrezne) snovi. Začetek preskusa je opredeljen s prvim hranjenjem s hrano z dodatkom. Preskusni dan traja od hranjenja do malo pred začetkom naslednjega hranjenja (npr. eno uro). Prvi preskusni dan absorpcije torej traja od prvega hranjenja s hrano z dodatkom in se konča malo pred drugim hranjenjem s hrano z dodatkom. V praksi se faza absorpcije konča malo pred (npr. eno uro) prvim hranjenjem s preskusno snovjo brez dodatka, saj bodo ribe še naprej prebavljale hrano z dodatkom in absorbirale preskusno snov v vmesnih 24 urah. Pomembno je zagotoviti, da se s preskusno snovjo doseže dovolj visoko (netoksično) obremenitev telesa glede na analitsko metodo, zato da se lahko med fazo očiščenja izmeri upad vsaj enega reda velikosti. V posebnih primerih se lahko faza absorpcije podaljša (do največ 28 dni) in uporabi dodatno vzorčenje, da se zberejo ugotovitve o kinetiki absorpcije. Med absorpcijo koncentracija v ribah morda ne bo dosegla stacionarnega stanja. Pri tem se lahko tako kot za preskus vodne izpostavljenosti uporabijo enačbe za oceno časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja, te pa pokažejo, kako dolgo najverjetneje traja, da se dosežejo znatne koncentracije v ribah (prim. Dodatek 5).

V nekaterih primerih je morda znano, da 7–14 dni za absorpcijo snovi v ribe ni dovolj, da bi uporabljena koncentracija hrane dosegla dovolj visoko koncentracijo v ribah, da bi se analiziral upad vsaj enega reda velikosti med očiščenjem, zaradi slabe analitske občutljivosti ali nizke učinkovitosti asimilacije. V takih primerih je morda priporočljivo podaljšati začetno fazo hranjenja na več kot 14 dni ali pa obravnavati višjo koncentracijo v hrani, zlasti za močno prebavljive snovi. Toda treba je paziti, da se obremenitev telesa med absorpcijo ohranja pod (ocenjeno) kronično koncentracijo brez opaznega učinka (NOEC) v ribjem tkivu (prim. odstavek 138).

Trajanje faze očiščenja

Očiščenje običajno traja do največ 28 dni in se začne, ko se ribe v preskusni skupini nahrani s čisto, netretirano hrano po fazi absorpcije. Očiščenje se začne s prvim dajanjem hrane „brez dodatka“ in ne takoj po zadnjem hranjenju s hrano „z dodatkom“, saj bodo ribe še naprej prebavljale hrano in absorbirale preskusno snov v vmesnih 24 urah, kot je opisano v odstavku 126. Zato se prvi vzorec v fazi očiščenja vzame malo pred drugim hranjenjem s hrano brez dodatka. Ta faza očiščenja je zasnovana tako, da vključuje snovi z morebitno razpolovno dobo do največ 14 dni, kar je skladno z razpolovno dobo bioakumulacijskih snovi ([1]), pri

([1]) V študiji vodne izpostavljenosti bi 14-dnevna razpolovna doba ustrezala BKF, ki znaša približno 10 000 l/kg, z uporabo rib z 1 g in ustrezno hitrostjo absorpcije, ki znaša približno 500 l/kg/d (v skladu z enačbo iz Sijm idr. (46)).

▼M7

čemer 28 dni torej zajema dve razpolovni dobi takih snovi. V primerih močno bioakumulacijskih snovi je morda priporočljivo podaljšati fazo očiščenja (če je to razvidno iz predhodnega preskušanja).

Če se snov očiščuje tako počasi, da v fazi očiščenja ni mogoče točno določiti razpolovne dobe, je morda še vedno na voljo dovolj informacij za namene ocenjevanja, da se pokaže visoka raven bioakumulacije. Če pa se snov očiščuje tako hitro, da ni mogoče izpeljati zanesljive koncentracije ob času nič (koncentracije ob koncu absorpcije/začetku očiščenja, $C_{0,d}$) in k_2, se lahko ugotovi previdna ocena k_2 (prim. Dodatek 7).

Če analize rib v zgodnejših intervalih (npr. 7 ali 14 dni) kažejo, da se je snov pred celotnim 28-dnevnim obdobjem očistila do te mere, da je padla pod mejo določljivosti, se lahko nadaljnje vzorčenje in preskus prekineta.

V nekaterih primerih ob koncu faze absorpcije (ali z drugim vzorcem očiščenja) morda ne pride do izmerljive absorpcije preskusne snovi. Če se lahko dokaže, da: i) so izpolnjena merila za veljavnost iz odstavka 113 in ii) do pomanjkanja absorpcije ni prišlo zaradi kakšne druge pomanjkljivosti preskusa (npr. prekratko trajanje absorpcije, pomanjkljiva tehnika za dodajanje snovi v hrano, ki povzroči slabo biološko dostopnost, pomanjkanje občutljivosti analitske metode, ribe ne jedo hrane itd.), se lahko študija prekine, ne da bi jo bilo treba znova izvesti z daljšim trajanjem absorpcije. Če so predhodne raziskave pokazale, da lahko pride do tega, je priporočljivo izvesti analizo iztrebkov za neprebavljeno preskusno snov v okviru pristopa „masne bilance“, če je to mogoče.

Število preskusnih rib

Podobno kot pri preskusu vodne izpostavljenosti je treba izbrati ribe podobne teže in dolžine, tako da najmanjše ribe niso manjše od dveh tretjin teže največjih (prim. odstavki 40–42).

Skupno število rib za študijo je treba izbrati na podlagi časovnega razporeda vzorčenja (najmanj en vzorec ob koncu faze absorpcije in štiri do šest vzorcev med fazo očiščenja, vendar je to odvisno od trajanja faz), pri tem pa je treba upoštevati občutljivost analitske tehnike, koncentracijo, ki bo najverjetneje dosežena ob koncu faze absorpcije (na podlagi predhodnega znanja), in trajanje očiščenja (če se lahko na podlagi predhodnega znanja izvede ocena). Ob vsakem dogodku je treba vzorčiti pet do deset rib, pri čemer se parametri rasti (teža in skupna dolžina) izmerijo pred analizo kemikalije in lipidov.

Zaradi neločljivih razlik v velikosti, hitrosti rasti in fiziologiji med ribami ter možnih razlik v količini dane hrane, ki jo poje vsaka riba, je v vsakem intervalu treba vzorčiti vsaj pet rib iz preskusne skupine in pet rib iz kontrolne skupine, da se ustrezno oceni povprečna koncentracija in njena variabilnost. Razlike med uporabljenimi ribami bodo verjetno prispevale več k skupni nenadzorovani variabilnosti preskusa kot pa k variabilnosti, ki je del uporabljenih analitskih metodologij, zato je v nekaterih primerih upravičena uporaba do največ deset rib na točko vzorčenja. Če pa koncentracije ozadja preskusne snovi v kontrolnih ribah niso izmerljive na začetku očiščenja, je morda dovolj kemijska analiza pri dveh do treh kontrolnih ribah v zadnjem intervalu vzorčenja, če se ob vseh točkah vzorčenja še vedno vzorčijo teža in skupna dolžina preostalih kontrolnih rib (zato da se vzorči rast istega števila rib iz preskusne in kontrolne skupine). Ribe je treba shraniti, posamezno stehtati (tudi če se izkaže, da je treba pozneje združiti rezultate vzorčenja) in izmeriti skupno dolžino.

▼M7

Za standardni preskus z na primer 28-dnevno fazo očiščenja, vključno s petimi vzorci očiščenja, to pomeni skupno 59–120 rib iz preskusne in 50–110 rib iz kontrolne skupine, pri čemer se predvideva, da se z analitsko tehniko za snov lahko izvede analiza vsebnosti lipidov na istih ribah. Če analize lipidov ni mogoče izvesti na istih ribah kot kemijsko analizo in če tudi ni izvedljivo uporabiti kontrolnih rib samo za analizo lipidov (prim. odstavek 56), je potrebnih dodatnih 15 rib (tri iz populacije staleža ob začetku preskusa, po tri ribe iz kontrolne in preskusne skupine ob začetku očiščenja ter po tri ribe iz kontrolne in preskusne skupine ob koncu preskusa). Primer časovnega razporeda vzorčenja s številom rib je opisan v Dodatku 4.

Obremenitev

Uporabiti je treba podobno visoka razmerja med vodo in ribami kot pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavka 43 in 44). Čeprav stopnje obremenitve med vodo in ribami v tem preskusu ne vplivajo na koncentracije izpostavljenosti, se priporoča stopnja obremenitve, ki znaša 0,1–1,0 g rib (mokra teža) na liter vode na dan, da se ohranijo ustrezne koncentracije raztopljenega kisika in čim bolj omeji stres pri preskusnih organizmih.

Preskusna hrana in hranjenje

Med aklimatizacijo je treba ribe hraniti z ustrezno hrano, kot je opisano zgoraj (odstavek 117). Če se preskus izvaja pod pretočnimi pogoji, je treba pretok med hranjenjem rib ustaviti.

Med preskusom mora hrana za preskusno skupino ustrezati tej, opisani zgoraj (odstavki 116–121). Poleg upoštevanja dejavnikov, značilnih za snov, analitske občutljivosti, pričakovane koncentracije v hrani pod pogoji v okolju in ravni kronične toksičnosti/obremenitve telesa je treba pri izbiri ciljne koncentracije za dodatek k hrani obravnavati tudi okusnost hrane (zato da je ribe ne zavračajo). V poročilu je treba navesti nominalno koncentracijo preskusne snovi za dodatek k hrani. Na podlagi izkušenj koncentracije za dodatek k hrani, ki znašajo 1–1000 μg/g, zagotavljajo praktično delovno območje za preskusne snovi, ki ne kažejo določenih toksičnih mehanizmov. Pri snoveh, ki delujejo z nedoločenim mehanizmom, ravni ostankov v tkivih ne smejo preseči 5 μmol/g lipidov, saj ostanki nad to ravnijo najverjetneje povzročajo kronične učinke (19), (48) in (50) ([1]). Pri drugih snoveh je treba paziti, da se zaradi akumulirane izpostavljenosti ne pojavijo neželeni učinki (prim. odstavek 127). To še zlasti velja, če se preskuša več kot ena snov hkrati (prim. odstavek 112).

Ustrezna količina preskusne snovi se lahko doda k ribji hrani na enega od treh načinov, opisanih v odstavku 119 in Dodatku 7. Metode in postopke za dodajanje preskusne snovi k hrani je treba opisati v poročilu. Kontrolne ribe je treba hraniti z netretirano hrano, ki vsebuje enako količino oljnega vehikla brez dodatka, če je ta bil uporabljen v hrani z dodatkom za fazo absorpcije, ali ki je tretirana s „čistim“ topilom, če je bilo za pripravo hrane za preskusno skupino uporabljeno topilo. Tretirano in netretirano hrano je treba vsaj trikrat analitsko izmeriti glede koncentracije preskusne snovi pred začetkom in ob koncu faze absorpcije. Po izpostavljenosti tretirani hrani (faza absorpcije), se ribe (obe skupini) hrani z netretirano hrano (faza očiščenja).

Ribe se hranijo z vnaprej določenim obrokom (glede na vrsto; npr. približno 1–2 % teže mokrega telesa na dan v primeru šarenke). Stopnjo hranjenja je treba izbrati tako, da se prepreči hitra rast in veliko povečanje vsebnosti lipidov.

([1]) Ker se dejanske notranje koncentracije lahko določijo samo po izvedbi preskusa, je treba oceniti pričakovano notranjo koncentracijo (npr. na podlagi pričakovanega BMF in koncentracije v hrani; prim. enačba A5.8 v Dodatku 5).

▼M7

Zabeležiti je treba točno stopnjo hranjenja, določeno med preskusom. Začetno hranjenje mora temeljiti na načrtovanih meritvah teže za populacijo staleža tik pred začetkom preskusa. Količino hrane je treba prilagoditi glede na mokro težo vzorčenih rib ob vsakem vzorčenju, da se upošteva rast med preskusom. Teža in dolžina rib v preskusnem in kontrolnem bazenu se lahko oceni na podlagi teže in skupne dolžine rib, ki se uporabijo ob vsakem vzorčenju; ne smejo se tehtati ali meriti preostale ribe v preskusnem in kontrolnem bazenu. Pomembno je, da se enaka stopnja hranjenja ohrani v celotnem preskusu.

Hranjenje je treba opazovati, da se zagotovi, da ribe vidno pojedo vso hrano, ki jim je dana, zato da bodo v izračunih uporabljene ustrezne hitrosti zaužitja. Pri izbiri stopnje hranjenja, ki bo zagotovila zaužitje vse hrane ob hranjenju enkrat na dan, je treba obravnavati predhodne preskuse hranjenja ali pretekle izkušnje Če hrana vedno ostane, je priporočljivo razporediti odmerek na dodatno obdobje hranjenja v vsakem preskusnem dnevu (npr. nadomestiti hranjenje enkrat na dan s hranjenjem polovice obroka dvakrat na dan). Če je to potrebno, je treba drugo hranjenje izvesti ob vnaprej določenem času in ga razporediti tako, da pred vzorčenjem rib preteče čim več časa (npr. čas za drugo hranjenje se določi v prvi polovici preskusnega dne).

Čeprav ribe na splošno zelo hitro pojedo hrano, je pomembno zagotoviti, da snov ostane adsorbirana na hrano. Prizadevati si je treba, da se preskusna snov ne bi razpršila iz hrane v vodo, saj bi se s tem ribe izpostavilo vodnim koncentracijam preskusne snovi poleg prehranske izpostavljenosti. To je mogoče zagotoviti tako, da se v eni uri od hranjenja odstranijo vsi ostanki hrane (in iztrebki) iz preskusnega in kontrolnega bazena, po možnosti pa v 30 minutah. Poleg tega se lahko uporabi sistem, pri katerem se voda neprestano čisti prek filtra iz aktivnega ogljika, da se absorbirajo kakršna koli „raztopljena“ onesnaževala. Pretočni sistemi lahko pripomorejo k hitrem spiranju delcev hrane in raztopljenih snovi ([1]). V nekaterih primerih lahko malo spremenjena tehnika priprave hrane z dodatkom pomaga olajšati to težavo (glej odstavek 119).

Svetloba in temperatura

Tako kot pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavek 48) se priporoča obdobje osvetljenosti od 12 do 16 ur in temperatura (± 2 °C) mora biti ustrezna za uporabljeno preskusno vrsto (prim. Dodatek 3). Vrsta in lastnosti svetlobe morajo biti znane in navedene.

Kontrole

Uporabiti je treba eno kontrolno skupino z ribami, ki se hranijo z istim obrokom kot preskusna skupina, vendar brez preskusne snovi v hrani. Če se je pri dodajanju preskusne snovi k hrani za preskusno skupino uporabilo olje ali topilo, je treba hrano kontrolne skupine tretirati na povsem enak način, vendar brez preskusne snovi, zato da sta hrani preskusne in kontrolne skupine enaki (prim. odstavka 121 in 139).

([1]) Morda ni mogoče povsem preprečiti prisotnost preskusne snovi v preskusnem mediju zaradi izločanja rib ali luženja iz hrane. Ena možnost je torej izmeriti koncentracijo snovi v vodi ob koncu faze absorpcije, zlasti če se uporablja polstatični sistem, da se lažje ugotovi, ali je prišlo do kakršne koli vodne izpostavljenosti.

▼M7

Pogostost meritev kakovosti vode

Pogoji, opisani pri metodi vodne izpostavljenosti, veljajo tudi za to metodo, razen tega, da je treba TOC izmeriti samo pred preskusom v okviru opredelitve lastnosti preskusne vode (prim. odstavek 53).

Vzorčenje ter analiza rib in hrane

Analiza vzorcev hrane

Vzorce preskusne in kontrolne hrane je treba analizirati vsaj trikrat za preskusno snov, za vsebnost lipidov pa vsaj pred začetkom in ob koncu faze absorpcije. V poročilo je treba vključiti metode analize in postopke za zagotavljanje homogenosti hrane.

Vzorce je treba analizirati za preskusno snov po uveljavljenih in validiranih metodah. Treba je izvesti predhodne raziskave, da se ugotovijo meja določljivosti, odstotek izkoristka, motnje in analitska variabilnost pri izbrani matriki vzorčenja. Če se preskuša izotopsko označen material, je treba obravnavati podobne ugotovitve kot pri metodi vodne izpostavljenosti, pri čemer prehranska analiza nadomesti vodno analizo (prim. odstavek 65).

Analiza rib

Ob vsakem vzorčenju rib je treba vzorčiti 5–10 posameznih rib iz preskusne in kontrolne skupine (v nekaterih primerih se število kontrolnih rib lahko zmanjša; prim. odstavek 134).

Vzorčenja morajo potekati vsak preskusni dan ob istem času (glede na hranjenje) in morajo biti razporejena tako, da je čim manjša verjetnost, da hrana ostane v črevesju med fazo absorpcije in v zgodnjem delu faze očiščenja, da se prepreči lažno prispevanje k skupnim koncentracijam preskusne snovi (tj. vzorčene ribe je treba odstraniti ob koncu preskusnega dne in pri tem upoštevati, da se preskusni dan začne ob hranjenju in konča ob naslednjem hranjenju, približno 24 ur pozneje. Očiščenje se začne s prvim hranjenjem s hrano brez dodatka; prim. odstavek 128). Prvi vzorec v fazi očiščenja (ki se vzame malo pred drugim hranjenjem s hrano brez dodatka) je pomemben, saj se ekstrapolacija za en dan nazaj iz te meritve uporabi za oceno koncentracije ob času nič ($C_{0,d}$, koncentracija v ribi ob koncu absorpcije/začetku očiščenja). Po izbiri se lahko odstrani gastrointestinalni trakt ribe in analizira ločeno ob koncu absorpcije ter 1. in 3. dan med očiščenjem.

Ob vsakem vzorčenju je treba odstraniti ribe iz obeh preskusnih posod in jih tretirati na enak način, kot je opisan pri metodi vodne izpostavljenosti (prim. odstavki 61–63).

Koncentracije preskusne snovi v celi ribi (mokra teža) se izmerijo vsaj ob koncu faze absorpcije in med fazo očiščenja v kontrolni in preskusni skupini. Med fazo očiščenja je priporočenih štiri do šest točk vzorčenja (npr. 1., 3., 7., 14. in 28. dan). Po izbiri se lahko vključiti dodatno točko vzorčenja po 1–3 dneh absorpcije, da se oceni učinkovitost asimilacije iz linearne faze absorpcije za ribo, ko je še na začetku obdobja izpostavljenosti. Možna sta dva glavna odstopanja od časovnega razporeda: i) če se za namene raziskovanja kinetike absorpcije uporabi podaljšana faza absorpcije, so med fazo absorpcije potrebne dodatne točke vzorčenja, zato je treba vključiti dodatne ribe (prim. odstavek 126); ii) če je bila študija prekinjena ob koncu faze absorpcije, ker ni bilo izmerljive absorpcije (prim. odstavek 131). Posamezne ribe, ki se vzorčijo, je treba stehtati (in izmeriti

▼M7

njihovo skupno dolžino), da se lahko določijo konstante hitrosti rasti. Ob koncu absorpcije in izbranih točkah očiščenja se lahko izmerijo tudi koncentracije snovi v določenem ribjem tkivu (užitnih in neužitnih delih). Če se preskuša izotopsko označen material, je treba obravnavati podobne ugotovitve kot pri metodi vodne izpostavljenosti, pri čemer prehranska analiza nadomesti vodno analizo (prim. odstavek 65).

Za periodično uporabo referenčne snovi (prim. odstavek 25) je treba koncentracije po možnosti meriti v preskusni skupini ob koncu absorpcije in vseh točkah očiščenja, ki so določene za preskusno snov (cela riba); v kontrolni skupini je treba analizirati koncentracije samo ob koncu absorpcije (cela riba). V določenih okoliščinah (na primer če sta analitski tehniki za preskusno snov in referenčno snov nezdružljivi, kar pomeni, da so v okviru časovnega razporeda vzorčenja potrebne dodatne ribe) se lahko uporabi drug pristop, opisan v nadaljevanju, da se čim bolj zmanjša število dodatnih rib. Koncentracije referenčne snovi se izmerijo med očiščenjem samo 1. in 3. dan ter ob dveh nadaljnjih točkah vzorčenja, izbranih tako, da se lahko zanesljivo ocenita koncentracija ob času nič ($C_{0,d}$) in k_2 za referenčno snov.

Če je mogoče, je treba vsebnost lipidov posameznih rib določiti ob vsakem vzorčenju ali vsaj ob začetku in koncu faze absorpcije ter ob koncu faze očiščenja. (prim. odstavka 56 in 67). Glede na analitsko metodo (glej odstavek 67 in Dodatek 4) se lahko morda uporabi iste ribe za določanje vsebnosti lipidov in koncentracije preskusne snovi. To je zaželeno zaradi čim manjšega števila rib. Če pa to ni mogoče, se lahko uporabiti enak pristop, kot je opisan pri metodi vodne izpostavljenosti (glej odstavek 56 za te druge možnosti merjenja lipidov). Metodo, ki se uporabi za količinsko opredelitev vsebnosti lipidov, je treba opisati v poročilu.

Kakovost analitske metode

Izvesti je treba preverjanja s preskušanjem, da se zagotovi specifičnost, točnost, natančnost in obnovljivost analitske tehnike, značilne za snov, ter izkoristke preskusne snovi iz hrane in rib.

Meritve rasti rib

Na začetku preskusa je treba stehtati vzorec rib iz populacije staleža (in izmeriti njihovo skupno dolžino). Te ribe je treba vzorčiti malo prvim hranjenjem s hrano z dodatkom (npr. eno uro) in jih dodeliti preskusnemu dnevu 0. Število rib za ta vzorec mora biti vsaj enako kot za vzorce med preskusom. Nekatere od teh rib so lahko iste kot te, ki so uporabljene za analizo lipidov pred začetkom faze absorpcije (prim. odstavek 153). Ob vsakem intervalu vzorčenja se ribe najprej stehtajo in izmeri se njihova dolžina. Za vsako posamezno ribo je treba izmerjeno težo (in dolžino) povezati z analizirano koncentracijo kemikalije (in vsebnostjo lipidov, kadar je to ustrezno), na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako vzorčeno ribo. Meritve teh vzorčenih rib se lahko uporabijo za oceno teže (in dolžine) preostalih rib v preskusnem in kontrolnem bazenu.

Preskusno vrednotenje

Vsak dan je treba izvesti in zabeležiti opazovanja v zvezi s smrtnostjo. Izvesti in zabeležiti je treba dodatna opazovanja za neželene učinke, na primer nenavadno vedenje ali pigmentacijo. Ribe se obravnavajo kot mrtve, če ni dihalnega gibanja in ni mogoče zaznati odziva na rahli mehanski dražljaj. Vse mrtve ali jasno umirajoče ribe je treba odstraniti.

▼M7

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Rezultati preskusa se uporabijo za izpeljavo konstante hitrosti očiščenja (k_2) kot funkcije skupne mokre teže rib. Izračuna se konstanta hitrosti rasti, k_g, ki temelji na povprečnem povečanju teže rib, in uporabi za izračun konstante hitrosti očiščenja, popravljene glede na rast, k_{2g}, kadar je to ustrezno. Poleg učinkovitosti asimilacije (a; absorpcija v črevesju), je treba v poročilu navesti kinetični biomagnifikacijski faktor (BMF_K) (ki je po potrebi popravljen glede na rast, BMF_{Kg}), njegovo vrednost, popravljeno glede na lipide (BMF_{KL} ali BMF_{KgL}, če je popravljen glede na razredčitev zaradi rasti), in stopnjo hranjenja. Izračunati je mogoče tudi oceno časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja v fazi absorpcije (npr. 95 % stacionarnega stanja ali $t_{95} = 3{,}0/k_2$), in vključi se lahko ocena stacionarnega BMF (BMF_{SS}) (prim. odstavka 105 in 106 ter Dodatek 5), če je iz vrednosti t_{95} razvidno, da so bili morda doseženi pogoji stacionarnega stanja. Ta BMF_{SS} je treba popraviti glede na lipide tako kot kinetično izpeljan BMF (BMF_K), da se dobi vrednost, popravljena glede na lipide, BMF_{SSL} (opozoriti je treba, da ni na voljo dogovorjenega postopka za popravljanje stacionarnega BMF glede na razredčitev zaradi rasti). Formule in primeri izračunov so predstavljeni v Dodatku 7. Na voljo so pristopi, ki omogočajo oceno kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_K) na podlagi podatkov, pridobljenih v prehranski študiji. Ti so opisani v Dodatku 8.

Podatki o teži/dolžini rib

Mokra teža in dolžina posameznih rib za vsa časovna obdobja se predstavita v preglednici ločeno za preskusno in kontrolno skupino za vse dneve vzorčenj med fazo absorpcije (populacija staleža za začetek absorpcije; kontrolno in preskusno skupino za konec absorpcije in, če se izvede, zgodnjo fazo (npr. 1.–3. dan absorpcije) ter fazo očiščenja (npr. 1., 2., 4., 7., 14. in 28. dan za kontrolno in preskusno skupino). Po možnosti se teža uporabi kot merilo za rast za namene popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti Glej opise v nadaljevanju (odstavka 162 in 163) ter Dodatek 5 za metode, uporabljene za popravljanje podatkov glede na razredčitev zaradi rasti.

Podatki o koncentraciji preskusne snovi v ribah

V preglednici se predstavijo meritve ostankov preskusne snovi v posameznih ribah (ali združenih vzorcev rib, če meritve posameznih rib niso mogoče), izražene v smislu koncentracije na mokro težo (masni delež), za preskusne in kontrolne ribe za posamezna vzorčenja. Če je bila na vsak vzorčeni ribi izvedena analiza lipidov, se lahko izpeljejo in v preglednici predstavijo posamezne koncentracije, popravljene glede na lipide, v smislu koncentracije lipidov (masni delež lipidov).

— Meritve ostankov preskusne snovi v posameznih ribah (ali združenih vzorcev rib, če meritve posameznih rib niso mogoče, prim. odstavek 66) za fazo očiščenja se pretvorijo v njihove naravne logaritme in grafično prikažejo v odvisnosti od časa (dan). Če vizualni pregled grafičnega prikaza pokaže očitne osamelce, se lahko uporabi statistično veljaven preskus osamelcev, da se odstranijo napačne podatkovne točke in zagotovi utemeljitev za njihovo opustitev.

— Izračuna se linearna korelacija po metodi najmanjših kvadratov za ln(koncentracijo) v odvisnosti od podatkov o očiščenju (dan). Naklon in osni odsek se v poročilu navedeta kot skupna konstanta hitrosti očiščenja (k_2) in naravni logaritem izpeljane koncentracije ob času nič ($C_{0,d}$) (prim. Dodatek 5 in Dodatek 7 za nadaljnje podrobnosti). Če to ni mogoče, ker koncentracije padejo pod mejo določljivosti za drugi vzorec očiščenja, se lahko izvede previdna ocena k_2 (prim. Dodatek 7).

— Variance v naklonu in osnem odseku se izračunajo s standardnimi statističnimi postopki, na podlagi teh rezultatov pa se ovrednotijo in predstavijo 90-odstotni (ali 95-odstotni) intervali zaupanja.

▼M7

— Izračuna se tudi povprečna izmerjena koncentracija v ribah za zadnji dan absorpcije (izmerjena koncentracija ob času nič, $C_{0,m}$) in primerja z izpeljano vrednostjo $C_{0,d}$. Če je izpeljana vrednost nižja od izmerjene vrednosti, lahko ta razlika kaže na prisotnost neprebavljene hrane z dodatkom v črevesju. Če je izpeljana vrednost precej višja od izmerjene vrednosti, lahko to kaže na to, da je vrednost, izpeljana iz linearne regresije podatkov o očiščenju, napačna in da jo je treba znova ovrednotiti (glej Dodatek 7).

Hitrost očiščenja in biomagnifikacijski faktor

Za izračun bimagnifikacijskega faktorja iz podatkov je naprej treba pridobiti učinkovitost asimilacije (absorpcijo preskusne snovi v črevesju, α). Za to je treba uporabiti enačbo A7.1 iz Dodatka 7, ki zahteva, da so znani izpeljana koncentracija v ribah ob času nič faze očiščenja ($C_{0,d}$), (skupna) konstanta hitrosti očiščenja (k_2), koncentracija v hrani (C_{hrana}), konstanta hitrosti zaužitja hrane (I) in trajanje faze absorpcije (t). Naklon in osni odsek linearnega razmerja med ln(koncentracijo) in trajanjem očiščenja se navedeta kot skupna konstanta hitrosti očiščenja (k_2 = naklon) in koncentracija ob času nič ($C_{0,d} = e^{intercept}$), kot je opisano zgoraj. Preveriti je treba, da so izpeljane vrednosti biološko verodostojne (npr. učinkovitost asimilacije kot delež ni višja od 1). *(I)* se izračuna tako, da se masa hrane deli z maso rib, ki se hranijo vsak dan (če se hranijo z 2 % telesne teže, (*I)* znaša 0,02). Stopnjo hranjenja, uporabljeno v izračunu, pa je morda treba prilagoditi glede na rast rib (to se lahko izvede z znano konstanto hitrosti rasti, da se oceni teža rib v vsaki točki časa med fazo absorpcije; prim. Dodatek 7). Kadar ni mogoče izpeljati k_2 in $C_{0,d}$, ker so na primer koncentracije padle pod mejo zaznavnosti za drugi vzorec očiščenja, se lahko izvede previdna ocena k_2 in BMF_k „zgornje meje“ (prim. Dodatek 7).

Ko se pridobi učinkovitost asimilacije (α), se lahko izračuna biomagnifikacijski faktor tako, da se α množi s konstanto hitrosti zaužitja (I) in deli s (skupno) konstanto hitrosti očiščenja (k_2). Biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast, se izračuna na enak način, uporabi pa se konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}; (prim. odstavka 162 in 163). Izpelje se lahko drugačna ocena učinkovitosti asimilacije, če je bila v zgodnji, linearni fazi faze absorpcije izvedena analiza ribjega tkiva; prim. odstavek 151 in Dodatek 7. Ta vrednost predstavlja neodvisno oceno učinkovitosti asimilacije za organizem, ki v bistvu ni bil izpostavljen (tj. ribe so pred začetkom faze absorpcije). Za izpeljavo BMF se običajno uporabi učinkovitost asimilacije, ocenjena na podlagi podatkov o očiščenju.

Popravek glede na lipide in razredčitev zaradi rasti

Rast rib med fazo očiščenja lahko zniža izmerjene koncentracije kemikalije v ribah, kar pomeni, da je skupna konstanta hitrosti očiščenja, k_2, višja, kot bi bila zgolj na podlagi procesov odstranjevanja (npr. metabolizem, izločanje) (prim. odstavek 72). Vsebnost lipidov v preskusnih ribah (ki je tesno povezana z bioakumulacijo hidrofobnih snovi) in vsebnost lipidov v hrani se lahko v praksi tako razlikujeta, da jih je treba popraviti, zato da se lahko biomagnifikacijske faktorje smiselno predstavi. Biomagnifikacijski faktor je treba popraviti glede na razredčitev zaradi rasti (tako kot kinetični BKF pri metodi vodne izpostavljenosti) in glede na vsebnost lipidov v hrani, ki je povezana z vsebnostjo lipidov v ribah (korekcijski faktor za lipide). Enačbe in primeri teh izračunov so opisani v Dodatku 5 oziroma Dodatku 7.

Za popravek glede na razredčitev zaradi rasti je treba izračunati konstanto hitrosti očiščenja, popravljeno glede na rast (k_{2g}) (glej Dodatek 5 za enačbe). Ta konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (k_{2g}), se nato uporabi za

▼M7

izračun biomagnifikacijskega faktorja, popravljenega glede na rast, kot je opisano v odstavku 73. V nekaterih primerih ta pristop ni mogoč. Drug pristop, ki ne zahteva popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti, pa zajema uporabo mase preskusne snovi na podatke o očiščenju za ribo (celo ribo) in ne običajne mase preskusne snovi na masno enoto podatkov o (koncentraciji v) ribi. Ta pristop je preprost, saj bi v preskusih, skladnih s to metodo, zabeležene koncentracije v tkivih morale biti povezane s težo posameznih rib. Preprost postopek za ta pristop je opisan v Dodatku 5. Opozoriti je treba, da je v poročilu še vedno treba oceniti in navesti k_2, čeprav je uporabljen drugi pristop.

Da se popravijo vrednosti glede na vsebnost lipidov v hrani in ribah, kadar analiza lipidov ni bila izvedena na vseh vzorčenih ribah, se izpeljejo povprečni deleži lipidov (masni delež) v ribah in hrani ([1]). Nato se izračuna korekcijski faktor za lipide (L_c), tako da se povprečni delež lipidov v ribah deli s povprečnim deležem lipidov v hrani. Biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast ali ne, kot je ustrezno, se deli s korekcijskim faktorjem za lipide, da se izračuna biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na lipide.

Če so bile analize kemikalije in lipidov izvedene na istih ribah v vsaki točki vzorčenja, se lahko podatki o tkivu, popravljeni glede na lipide, za posamezne ribe uporabijo neposredno za izračun BMF, popravljenega glede na lipide (prim. (37)). Z grafičnim prikazom koncentracije, popravljene glede na lipide, se dobi $C_{0,d}$ na podlagi lipidov in k_2. Nato se lahko izvede matematična analiza z enakimi enačbami iz Dodatka 7, učinkovitost asimilacije (a) pa se izračuna s konstanto hitrosti zaužitja hrane, normalizirano glede na lipide (I_{lipid}), in koncentracijo v hrani na podlagi lipidov ($C_{\text{hrana-lipid}}$). Parametri, popravljeni glede na lipide, se nato podobno uporabijo za izračun BMF (opozoriti je treba, da se popravek konstante hitrosti rasti uporabi tudi za delež lipidov, ne pa za mokro težo ribe, da se izračuna BMF_{KgL}, popravljen glede na lipide in rast).

Razlaga rezultatov

Povprečna rast v preskusni in kontrolni skupini načeloma ne bi smela biti bistveno drugačna, da se lahko izključijo toksični učinki. Konstanti hitrosti rasti ali krivulji rasti obeh skupin je treba primerjati z ustreznim postopkom ([2])).

Poročilo o preskusu

Po koncu študije se pripravi končno poročilo z informacijami o *preskusni snovi*, *preskusni vrsti* in *preskusnih pogojih* v skladu z odstavkom 81 (kot pri metodi vodne izpostavljenosti). Poleg tega se zahtevajo naslednji podatki:

Preskusna snov:

— kakršne koli informacije o obstojnosti preskusne snovi v pripravljeni hrani.

([1]) Ta pristop je značilen za prehransko študijo in je drugačen od postopka pri vodni izpostavljenosti, zato je bila namesto „normalizacije“ uporabljena beseda „popravek“, da se prepreči nejasnosti – glej tudi opombo v odstavku 106.

([2]) Izvede se lahko *t*-test na konstantah hitrosti rasti, da se preskusi, ali je rast v kontrolni in preskusni skupini različna, ali *F*-test v primeru analize variance. *F*-test ali preskus razmerja verjetnosti se lahko po potrebi uporabi za pomoč pri izbiri ustreznega modela rasti (monografija OECD 54, (32)).

▼M7

Preskusni pogoji:

— nominalna koncentracija snovi v hrani, tehnika za dodajanje snovi v hrano, količina vehikla (lipidov), uporabljena pri postopku dodajanja snovi v hrano (če se uporabi), meritve koncentracije preskusne snovi v hrani z dodatkom za vsako analizo (vsaj tri pred začetkom študije in ob koncu absorpcije) in povprečne vrednosti;

— vrsta in kakovost oljnega nosilca ali topila (kategorija, dobavitelj itd.), ki in če se je uporabil za dodajanje k hrani;

— uporabljena vrsta hrane (približna analiza [1]), kategorija ali kakovost, dobavitelj itd.), stopnja hranjenja med fazo absorpcije, količina dane hrane in pogostost (vključno z morebitnimi prilagoditvami na podlagi teže vzorčenih rib);

— čas, ko so bile ribe zbrane in evtanazirane za kemijsko analizo za vsako točko vzorčenja (npr. eno uro pred hranjenjem naslednjega dne).

Rezultati:

— rezultati kakršnih koli predhodnih študij;

— informacije o kakršnih koli ugotovljenih neželenih učinkih;

— popoln opis vseh uporabljenih postopkov kemijske analize, vključno z mejo zaznavnosti in določljivosti, variabilnostjo in izkoristkom;

— izmerjene koncentracije lipidov v hrani (hrana z dodatkom in kontrolna hrana), vrednosti za posamezne ribe, povprečne vrednosti in standardni odkloni;

— v preglednici predstavljeni podatki o teži (in dolžini) rib, povezani s posameznimi ribami za kontrolno in preskusno skupino (na primer z uporabo edinstvene identifikacijske kode za vsako ribo), in izračuni, izpeljane konstante hitrosti rasti in 95-odstotni intervali zaupanja;

— v preglednici predstavljeni podatki o koncentraciji preskusne snovi v ribah, povprečna izmerjena koncentracija ob koncu absorpcije ($C_{0,m}$), izpeljana (skupna) konstanta hitrosti očiščenja (k_2) in koncentracija v ribah ob začetku faze očiščenja ($C_{0,d}$) skupaj z variancami teh vrednosti (naklon in osni odsek);

— v preglednici predstavljeni podatki o vsebnosti lipidov v ribah (navedeni v odvisnosti od določenih koncentracij snovi, kadar je to ustrezno), povprečne vrednosti za preskusno in kontrolno skupino ob začetku preskusa ter koncu absorpcije in očiščenja;

— krivulje (vključno z vsemi izmerjenimi podatki), ki kažejo naslednje (če je ustrezno, se lahko koncentracije izrazijo glede na celo telo živali ali določena tkiva te živali):

  — rast (*tj.* teža (in dolžina) ribe v odvisnosti od časa) ali teža v odvisnosti od časa, pretvorjena v naravni logaritem;

[1] Tehnika za analizo hrane za proteine, lipide, surove vlaknine in pepel; te informacije so običajno na voljo pri dobavitelju hrane.

▼M7

— očiščenje preskusne snovi v ribi in

— koncentracija, pretvorjena v naravni logaritem (koncentracija ln), v odvisnosti od časa očiščenja (vključno z izpeljano konstanto hitrosti očiščenja, k_2, in koncentracijo, izpeljano iz naravnega logaritma, v ribah ob začetku faze očiščenja, $C_{0,d}$);

— če vizualni pregled grafičnega prikaza pokaže očitne osamelce, se lahko uporabi statistično veljaven preskus osamelcev, da se odstranijo napačne podatkovne točke in zagotovi utemeljitev za njihovo opustitev;

— izračunana konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast, in razpolovna doba, popravljena glede na rast;

— izračunana učinkovitost asimilacije (α);

— „surovi“ prehranski BMF, kinetični BMF, popravljen glede na lipide in razredčitev zaradi rast („surovi“ in popravljen glede na lipide na podlagi mokre teže cele ribe), BMF za tkivo, če je ustrezno;

— kakršne koli informacije o metabolitih izotopsko označene preskusne snovi in njihovem kopičenju;

— kar koli nenavadnega v zvezi s preskusom, kakršno koli odstopanje od teh postopkov in vsi drugi pomembni podatki;

— preglednica s povzetimi, ustreznimi, izmerjenimi in izračunanimi podatki, kot sledi v nadaljevanju:

Konstante hitrosti očiščenja snovi in biomagnifikacijski faktorji (BMF_K)	
k_g (konstanta hitrosti rasti; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) (1)
k_2 (skupna konstanta hitrosti očiščenja, dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI)
k_{2g} (konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast; dan^{-1}):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) (1)
$C_{0,m}$ (izmerjena koncentracija ob času nič, koncentracija v ribah ob koncu absorpcije) (µg/g):	vstavi vrednost ± SD (2)
$C_{0,d}$ (izpeljana koncentracija ob času nič v fazi očiščenja; µg/g):	vstavi vrednost ± SD (2)
I (hitrost zaužitja določenega obroka hrane; g hrana/g riba/dan):	vstavi vrednost
I_g (dejanska stopnja hranjenja, prilagojena glede na rast; g hrana/g riba/dan) (2):	vstavi vrednost ± SD (2)
C_{hrana} (koncentracija kemikalije v hrani; µg/g):	vstavi vrednost ± SD (2)
α (učinkovitost asimilacije snovi):	vstavi vrednost ± SD (2)
BMF_K (kinetični prehranski BMF):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) (1)
BMF_{Kg} (kinetični prehranski BMF, popravljen glede na rast):	vstavi vrednost (95-odstotni CI) (1)

▼**M7**

Konstante hitrosti očiščenja snovi in biomagnifikacijski faktorji (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (razpolovna doba, popravljena glede na rast, v dnevih):	vstavi vrednost ± SD ([2])
*L*c (korekcijski faktor za lipide):	vstavi vrednost
BMF_{KgL} (kinetični BMF, popravljen glede na rast in lipide):	vstavi vrednost
$BMF_{SS\text{-}L}$ (indikativen stacionarni BMF, popravljen glede na lipide) ([2]):	vstavi vrednost ± SD ([2])

([1]) CI (confidence interval): interval zaupanja (kadar ga je mogoče oceniti)
([2]) SD (standard deviation): standardni odklon (kadar ga je mogoče oceniti)

VIRI

(1) Poglavje C.13 te priloge: *Bioakumulacija: pretočni preskus na ribah*.

(2) Poglavje A.6 te priloge: *Topnost v vodi*

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Poglavje A.8 te priloge: Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda): metoda *stresanja bučke*.

(5) Poglavje A.24 te priloge: Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda), metoda HPLC.

(6) Poglavje A.23 te priloge: Porazdelitveni koeficient (1-oktanol/voda): metoda počasnega mešanja.

(7) Poglavje C.7 te priloge: Hidroliza kot funkcija pH.

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Pariz, Francija.

(9) Poglavje A.5 te priloge: Površinska napetost vodnih raztopin.

(10) Poglavje A.4 te priloge: Parni tlak.

(11) Poglavje C.4 te priloge: Določanje „dobre“ biorazgradljivosti.

(12) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biorazgradljivost – CO_2 v zaprtih posodah.

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Na voljo na: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. in Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. in Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. in Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. in Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. in Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. in Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. objavljeno: 3. aprila 2012.

(22) Poglavje C.47 te priloge: Ribe, preskus toksičnosti za zgodnje razvojne stopnje.

(23) Poglavje C.15 te priloge: Ribe, preskus kratkotrajne toksičnosti na embriih in mladicah s hranilnim mešičkom.

(24) Poglavje C.14 te priloge: Preskus rasti ribjih mladic.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Pariz, Francija.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, ZDA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, ZDA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, ZDA

(29) Bligh E.G. in Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. in Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Pariz, Francija.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. in Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, ZDA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. in Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. in Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (predstavitev). na 12. letni seji SETAC Europe: Madrid, Španija.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. in Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonimni avtor (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, dokument predložen TC-NES WG o PBT.

(39) Anonimni avtor (2004), Background document to the fish dietary study protocol, dokument predložen TC-NES WG o PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. in Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. in Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. in Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. in Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. in van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. in Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. in Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. in Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Disertacija. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, ZDA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. in Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Pariz, Francija.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV IN ENOTE

Učinkovitost asimilacije (α) je merilo relativne količine snovi, absorbirane iz črevesja v organizem (α nima enote, ampak je pogosto izražena kot odstotek in ne kot delež).

Bioakumulacija se na splošno opisuje kot postopek, pri katerem koncentracija snovi v organizmu doseže raven, ki presega to v respiratornem mediju (npr. voda za ribe ali zrak za sesalce), hrani ali obojem(1).

Biokoncentracija je povečana koncentracija preskusne snovi v ali na organizmu (ali določenih tkivih organizma), ki je odvisna od koncentracije preskusne snovi v okoliškem mediju.

Biokoncentracijski faktor (BKF ali K_B) je koncentracija preskusne snovi v/na ribah ali določenih ribjih tkivih kadar koli med fazo absorpcije v tem preskusu kopičenja (C_f kot mg/kg), deljena s koncentracijo snovi v okoliškem mediju (C_w kot mg/l). BKF se izrazi v l kg^{-1}. Treba je opozoriti, da niso upoštevani popravki glede na rast in/ali standardno vsebnost lipidov.

Biomagnifikacija je povečana koncentracija preskusne snovi v ali na organizmu (ali določenih tkivih organizma), ki je odvisna od koncentracije preskusne snovi v hrani.

Biomagnifikacijski faktor (BMF) je koncentracija snovi v plenilcu, ki je odvisna od koncentracije v plenilčevem plenu (ali hrani) v stacionarnem stanju. V metodi, opisani v tej preskusni metodi, je izpostavljenost prek vodne faze previdno izpuščena, zato vrednosti BMF iz te preskusne metode ni mogoče neposredno primerjati z vrednostjo BMF iz terenske študije (v kateri sta morda združeni vodna in prehranska izpostavljenost).

Prehranski biomagnifikacijski faktor (prehranski BMF) je pojem, ki se v tej preskusni metodi uporablja za opis rezultata preskusa prehranske izpostavljenosti, v katerem je izpostavljenost prek vodne faze previdno izpuščena, zato vrednosti prehranskega BMF iz te preskusne metode ni mogoče neposredno primerjati z vrednostjo BMF iz terenske študije (v kateri sta morda združeni vodna in prehranska izpostavljenost).

Faza očiščenja ali faza (izgube) po izpostavljenosti je obdobje po prenosu preskusnih rib iz medija s preskusno snovjo v medij brez te snovi, ko se prouči očiščenje (ali čista izguba) snovi iz preskusnih rib (ali določenih ribjih tkiv).

Konstanta hitrosti očiščenja (izgube) (k_2) je številčna vrednost, ki določa hitrost zmanjšanja koncentracije preskusne snovi v preskusnih ribah (ali določenih ribjih tkivih) po prenosu preskusnih rib iz medija s preskusno snovjo v medij brez te snovi (k_2 se izrazi v dan^{-1}).

Raztopljeni organski ogljik (DOC, dissolved organic carbon) je merilo koncentracije ogljika, ki izvira iz raztopljenih organskih virov v preskusnih medijih.

Faza izpostavljenosti ali absorpcije je obdobje, v katerem so ribe izpostavljene preskusni snovi.

Stopnja zaužitja hrane (I) je povprečna količina hrane, ki jo vsak dan pojedo ribe in je odvisna od ocene povprečne celotne telesne teže ribe (izražena v g hrana/g riba/dan).

▼M7

Kinetični biokoncentracijski faktor (BKF_K) je razmerje med konstanto hitrosti absorpcije, k_1, in konstanto hitrosti očiščenja, k_2 (tj. k_1/k_2 – glej ustrezne opredelitve v tem Dodatku). Načeloma bi ta vrednost morala biti primerljiva z BKF_{SS} (glej že navedeno opredelitev), vendar lahko pride do odstopanj, če stacionarno stanje ni bilo zagotovo doseženo ali če je bil kinetični BKF popravljen glede na rast.

Kinetični biokoncentracijski faktor, normaliziran glede na lipide (BKF_{KL}), je normaliziran na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov.

Kinetični biokoncentracijski faktor, normaliziran glede na lipide in popravljen glede na rast (BKF_{KgL}), je normaliziran na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov in popravljen glede na rast med obdobjem študije, kot je opisano v Dodatku 5.

Stacionarni biokoncentracijski faktor, normaliziran glede na lipide (BKF_{SSL}), je normaliziran na ribo s 5-odstotno vsebnostjo lipidov.

Snov z več sestavinami je za namene registracije, evalvacije, avtorizacije in omejevanja kemikalij (REACH) opredeljena kot snov, ki ima več kot eno glavno sestavino s koncentracijo, ki znaša od 10 % do 80 % (masni delež).

Porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (K_{OW}) je razmerje med topnostjo snovi v *n*-oktanolu in vodi v stacionarnem stanju (metode A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); izrazi se tudi kot P_{OW}. Logaritem K_{OW} se uporablja kot pokazatelj potenciala snovi za biokoncentracijo v vodnih organizmih.

Delci organskega ogljika (POC, particulate organic carbon) so merilo koncentracije ogljika, ki izvira iz suspendiranih organskih virov v preskusnih medijih.

Mikroekstrakcija na trdni fazi (SPME) je analitska tehnika, pri kateri se ne uporablja topilo in ki je bila razvita za sisteme redčenja. Pri tej metodi se vlakno, prevlečeno s polimerom, izpostavi plinski ali tekoči fazi, ki vsebuje preiskovani analit. Načeloma se uporabi čim krajši čas analize, da se vzpostavijo pogoji stacionarnega stanja med trdno in tekočo fazo glede na izmerjeno vrsto. Nato se lahko koncentracija preiskovanega analita določi neposredno iz vlakna ali po njegovi ekstrakciji iz vlakna v topilo glede na tehniko določanja.

Stacionarno stanje je doseženo v grafičnem prikazu preskusne snovi v ribah (C_f) v odvisnosti od časa, ko krivulja postane vzporedna s časovno osjo in so tri zaporedne analize C_f na vzorcih, vzetih v intervalu najmanj dveh dni, v območju ± 20 % druga od druge ter ni precejšnjega povečanja C_f v času med prvo in zadnjo zaporedno analizo. Pri analiziranju združenih vzorcev so potrebne najmanj štiri zaporedne analize. Za preskusne snovi, ki se absorbirajo počasi, so primernejši sedemdnevni intervali.

Stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}) se v daljšem časovnem obdobju znatno ne spreminja, pri čemer je koncentracija preskusne snovi v okoliškem mediju v tem obdobju konstantna (prim. opredelitev stacionarnega stanja).

Skupni organski ogljik (TOC, total organic carbon) je merilo koncentracije ogljika, ki izvira iz vseh organskih virov v preskusnih medijih, vključno z viri v obliki delcev in raztopljenimi viri.

Konstanta hitrosti absorpcije (k_1) je številčna vrednost, ki določa hitrost povečanja koncentracije preskusne snovi v/na preskusni ribi (ali določenem ribjem tkivu), ko so ribe izpostavljene navedeni snovi (k_1 se izrazi v $l\ kg^{-1}\ dan^{-1}$).

Snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali so znani kot UVCB.

▼**M7**

Kemikalija je snov ali zmes.

Preskusna kemikalija je katera koli snov ali zmes, ki se preskuša s to preskusno metodo.

VIRI

(1) Gobas F. A. P. C., de Wolf W., Burkhard L. P., Verbruggen E. in Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

(2) .Poglavje A.8 te Priloge: *Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda): metoda stresanja bučke.*

(3) Poglavje A.24 te Priloge: *Porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda): metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)*.

(4) Poglavje A.23 te Priloge: *Porazdelitveni koeficient (1-oktanol/voda): metoda počasnega mešanja*.

▼M7

Dodatek 2

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Sestavina	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amoniak	1 µg/l
ostanek klora	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

▼M7

Dodatek 3

VRSTE RIB, PRIPOROČENE ZA PRESKUŠANJE

Priporočene vrste	Priporočeno območje preskusnih temperatur (°C)	Priporočena skupna dolžina poskusnih živali (cm) ([2])
Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) navadna cebrica	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) črnoglavi pisanec	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) krap	20–25	8,0 ± 4,0 ([3])
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck in Schlegel) medaka	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) gupi	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) sončni ostriž	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) šarenka	13–17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) zet	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer idr. (1)

([2]) Opozoriti je treba, da se v preskusu po možnosti uporablja teža kot merilo za velikost in izpeljave konstant hitrosti rasti. Vendar je dolžina bolj praktično merilo, če je treba na začetku preskusa ribe izbrati na pogled (tj. iz populacije staleža).

([3]) To območje je navedeno v Testing Methods for New Chemical Substances etc. (Preskusne metode za nove kemijske snovi), ki temelji na japonskem zakonu za nadzor kemijskih snovi (CSCL, Chemical Substances Control Law).

Različne rečne in morske vrste so bile manj uporabljene, na primer:

zebrasta grba (*Leiostomus xanthurus*)

ovčjeglavi zobati krapovec (*Cyprinodon variegatus*)

bibavični gavun (*Menidia beryllina*)

svetlikavi ostriž (*Cymatogaster aggregata*)

angleška iverka (*Parophrys vetulus*)

tihomorski jelenjerogi kapelj (*Leptocottus armatus*)

zet (*Gasterosteus aculeatus*)

brancin (*Dicentracus labrax*)

zelenika (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Sladkovodne ribe, navedene v zgornji preglednici, je preprosto gojiti in/ali so na splošno na voljo celo leto, razpoložljivost morskih in rečnih vrst pa je deloma omejena na posamezne države. Lahko se razmnožujejo in gojijo v ribogojnicah ali laboratoriju v pogojih, kjer se nadzorujejo bolezni in zajedavci, zato da bodo poskusne živali zdrave in znanega porekla. Te ribe so na voljo v mnogih predelih sveta.

VIRI

(1) Meyer A., Biermann C.H. in Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Dodatek 4

ČASOVNI RAZPOREDI VZORČENJA ZA PRESKUSE VODNE IN PREHRANSKE IZPOSTAVLJENOSTI

1. **Teoretični primer časovnega razporeda vzorčenja za celotni preskus vodne izpostavljenosti za ugotavljanje biokoncentracije snovi z log K_{OW} = 4.**

Vzorčenje rib	Časovni razpored vzorčenja		Število vodnih vzorcev ([1])	Število rib na vzorec ([1])
	Minimalna zahtevana pogostost (v dnevih) ([2])	Dodatno vzorčenje (v dnevih) ([2])		
Faza absorpcije				
1	– 1		2 ([3])	4 ([4])
	0		(2)	(3 ([6]))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4–8 ([5])
				(3 ([6]))
Faza očiščenja				Prenos rib v vodo brez preskusne snovi
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4–8 ([5])
		17,5		(4+3 ([6]))
SKUPAJ				40–72 (48–80) ([5])

([1]) Vrednosti v oklepajih so števila vzorcev (vode, rib), ki jih je treba vzeti, če se izvede dodatno vzorčenje.

([2]) Ocena k_2 pred preskusom za log K_{OW}, ki znaša 4,0, je 0,652 dni^{-1}. Skupno trajanje preskusa znaša 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dni, tj. 14 dni. Za oceno t_{SS} glej Dodatek 5.

([3]) Vodo je treba vzorčiti po najmanj treh zamenjanih prostorninah v komori.

([4]) Te ribe se vzorčijo iz populacije staleža.

([5]) Če je treba izvesti študije z večjo natančnostjo ali študije metabolizma, ki zahtevajo več rib, je treba te vzorčiti zlasti ob koncu faze absorpcije in očiščenja (prim. odstavek 40).

([6]) Za analizo vsebnosti lipidov bodo potrebne vsaj tri dodatne ribe, če ni mogoče uporabiti istih rib, ki so bile vzorčene za koncentracije snovi na začetku preskusa ter ob koncu faze absorpcije in očiščenja. Opozoriti je treba, da se v mnogih primerih lahko uporabijo samo tri kontrolne ribe (prim. odstavek 56).

▼M7

2. **Teoretični primer časovnega razporeda vzorčenja za preskus prehranske bioakumulacije snovi z desetdnevno fazo absorpcije in 42-dnevno fazo očiščenja**

Vzorčenje	Časovni razpored vzorčenja		Število vzorcev hrane	Število rib na vzorec	
	Dan faze	Dodatni vzorci rib?		Preskusna skupina	Kontrolna skupina
Faza absorpcije					
1	0	možni (1) (2)	3 – preskusna skupina	0	5–10
			3 – kontrolna skupina (1)		(8–13) (2)
1A (3)	1–3			5–10	5–10
2	10	da (4)	3 – preskusna skupina	10–15 (4)	5–10
			3 – kontrolna skupina (1)	(13–18) (5)	(8–13) (5)
Faza očiščenja					
3	1	da (4)		10–15 (4)	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10
6	7	da (4)		10–15 (4)	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	da (4)		10–15 (4) (13–18) (5)	5–10 (8–13) (5)
SKUPAJ				59–120 (63–126) (4) (5)	50–110 (56–116) (4) (5)

(1) Trije vzorci hrane iz kontrolne in preskusne skupine, analizirani glede koncentracij preskusne snovi in vsebnosti lipidov.
(2) Ribe se vzorčijo iz populacije staleža čim bližje začetku študije; vsaj tri ribe iz populacije staleža je treba na začetku preskusa vzorčiti za vsebnost lipidov.
(3) (Izbirno) vzorčenje v zgodnji fazi absorpcije zagotovi podatke za izračun prehranske asimilacije preskusne snovi, ki jo je mogoče primerjati z učinkovitostjo asimilacije, ki se izračuna iz podatkov o fazi očiščenja.
(4) Vzorči se lahko pet dodatnih rib za analizo določenega tkiva.
(5) Za analizo vsebnosti lipidov bodo potrebne vsaj tri dodatne ribe, če ni mogoče uporabiti istih rib, ki so bile vzorčene za koncentracije snovi na začetku preskusa ter ob koncu faze absorpcije in očiščenja. Opozoriti je treba, da se v mnogih primerih lahko uporabijo samo tri kontrolne ribe (prim. odstavka 56 in 153).

Opomba o časovnih razporedih faz in vzorčenja: Faza absorpcije se začne s prvim hranjenjem s hrano z dodatkom. Preskusni dan traja od enega hranjenja do malo pred naslednjim hranjenjem čez 24 ur. Prvo vzorčenje (1 v preglednici) je treba izvesti malo pred prvim hranjenjem (npr. eno uro). Vzorčenje med študijo je treba načeloma izvesti malo pred hranjenjem naslednjega dne (tj. približno 23 ur po hranjenju na dan vzorčenja). Faza absorpcije se konča malo pred prvim hranjenjem s hrano brez dodatka, ko se začne faza očiščenja (preskusna skupina rib bo verjetno še naprej prebavljala hrano z dodatkom v vmesnih 24 urah po zadnjem hranjenju s hrano z dodatkom). To pomeni, je treba vzorec ob koncu faze absorpcije vzeti malo pred prvim hranjenjem s hrano brez dodatka, prvi vzorec v fazi očiščenja pa je treba vzeti približno 23 ur po prvem hranjenju s hrano brez dodatka.

▼M7

Dodatek 5

SPLOŠNI IZRAČUNI

1. Uvod

2. Napoved trajanja faze absorpcije

3. Napoved trajanja faze očiščenja

4. Zaporedna metoda: določitev konstante hitrosti očiščenja (izgube) k_2

5. Zaporedna metoda: določitev konstante hitrosti absorpcije k_1 (samo za metodo vodne izpostavljenosti)

6. Sočasna metoda za izračun konstant hitrosti absorpcije in očiščenja (izgube) (samo za metodo vodne izpostavljenosti)

7. Popravek glede na razredčitev zaradi rasti za kinetični BKF in BMF

8. Normalizacija lipidov na 5-odstotno vsebnost lipidov (samo za metodo vodne izpostavljenosti)

1. UVOD

Splošni model vodne bioakumulacije v ribah se lahko opiše v smislu procesov absorpcije in izgube, pri čemer se zanemari absorpcija s hrano. Diferencialna enačba (dC_f/dt), ki opisuje hitrost spremembe v koncentraciji v ribah ($mg \cdot kg^{-1} \cdot dan^{-1}$), je (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[enačba A5.1]}$$

pri čemer

k_1 = konstanta hitrosti prvega reda za absorpcijo v ribah ($l\ kg^{-1} \cdot dan^{-1}$).

k_2 = konstanta hitrosti prvega reda za očiščenje v ribah (dan^{-1}).

k_g = konstanta hitrosti prvega reda za rast rib („razredčitev zaradi rasti“) (dan^{-1})

k_m = konstanta hitrosti prvega reda za metabolično transformacijo (dan^{-1})

k_e = konstanta hitrosti prvega reda za izločanje iztrebkov (dan^{-1})

C_w = koncentracija v vodi ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = koncentracija v ribah ($mg \cdot kg^{-1}$ mokre teže).

Za bioakumulacijske snovi se lahko pričakuje, da je tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu (TWA, time-weighted average) najustreznejša koncentracija izpostavljenosti v vodi (C_w) v dovoljenem območju odstopanja (prim. odstavek 24). Priporočeno je, da se tehtano povprečje koncentracije v vodi v določenem časovnem intervalu izračuna v skladu s postopkom iz Dodatka 6 preskusne metode C.20 (2). Opozoriti je treba, da je pretvorba koncentracije v vodi v naravni logaritem ustrezna, ko se pričakuje eksponentno upadanje med obdobji obnavljanja, npr. pri polstatičnem načrtu preskusa. Pri pretočnem sistemu morda ni potrebna pretvorba koncentracij izpostavljenosti v naravni logaritem. Če se izpelje tehtano povprečje koncentracij v vodi v določenem časovnem intervalu, jih je treba navesti v poročilu in uporabiti v nadaljnjih izračunih.

V standardnem preskusu BKF na ribah se lahko absorpcija in očiščenje opišeta v smislu dveh procesov kinetike prvega reda.

▼M7

Hitrost absorpcije = $k_1 \times C_w$ [enačba A5.2]

Skupna hitrost izgube = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [enačba A5.3]

V stacionarnem stanju in ob predvidevanju, da sta rast in metabolizem zanemarljiva (tj. vrednosti za k_g in k_m ni mogoče ločiti od nič), je hitrost absorpcije enaka hitrosti očiščenja, zato se z združitvijo enačb A5.2 in A5.3 dobi naslednje razmerje:

$$BCF = \frac{C_{f\,-SS}}{C_{w\,-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [enačba A5.4]

pri čemer

$C_{f\text{-}SS}$ = koncentracija v ribah v stacionarnem stanju (mg kg^{-1} mokre teže).

$C_{w\text{-}SS}$ = koncentracija v vodi v stacionarnem stanju (mg l^{-1}).

Razmerje k_1/k_2 je znano kot kinetični BKF (BKF_K) in mora biti enako stacionarnemu BKF (BKF_{SS}), ki se pridobi iz razmerja med stacionarno koncentracijo v ribah in to v vodi, vendar lahko pride do odstopanj, če stacionarno stanje ni bilo zagotovo doseženo ali če je bil kinetični BKF popravljen glede na rast. Ampak ker sta k_1 in k_2 konstanti, za izpeljavo BKF_K ni potrebno, da je doseženo stacionarno stanje.

Na podlagi teh enačb prvega reda so v ta Dodatek 5 zajeti splošni izračuni, ki so potrebni za metode vodne in prehranske izpostavljenosti za ugotavljanje bioakumulacije. Oddelki 5, 6 in 8 sicer veljajo samo za metodo vodne izpostavljenosti, ampak so v ta dodatek vključeni kot „splošne“ tehnike. Zaporedne (oddelka 4 in 5) in sočasne (oddelek 6) metode omogočajo izračun konstant absorpcije in očiščenja, ki se uporabijo za izpeljavo kinetičnih BKF. Zaporedna metoda za določanje k_2 (oddelek 4) je pomembna pri prehranski metodi, saj je potrebna za izračun učinkovitosti asimilacije in BMF. V Dodatku 7 so izračuni, ki so značilni za prehransko metodo.

2. NAPOVED TRAJANJA FAZE ABSORPCIJE

Pred izvedbo preskusa se lahko pridobi ocena k_2 in s tem določen odstotek časa, ki je potreben za doseganje stacionarnega stanja, na podlagi empiričnih razmerij med k_2 in porazdelitvenim koeficientom *n*-oktanol/voda (K_{OW}) ali k_1 in BKF. Toda opozoriti je treba, da se enačbe v tem oddelku lahko uporabijo samo, če absorpcija in očiščenje sledita kinetiki prvega reda. Če ji očitno ne sledita in če je treba napovedati trajanje faze absorpcije, je priporočeno poiskati nasvet biostatistika in/ali farmakokinetika.

Oceno k_2 (dan^{-1}) je mogoče dobiti z več metodami. Naslednja empirična razmerja se lahko na primer uporabijo v prvem primeru ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ (r^2=0,95) [(3); enačba A5.5]

ali

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [enačba A5.6]

pri čemer (za snovi z log K_{OW} > 3) (r^2=0,85)[(4); enačba A5.7]

([1]) Kot pri vsakem empiričnem razmerju je treba preveriti, da je preskusna snov v območju uporabe razmerja.

▼M7

in $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); enačba A5.8]

W = povprečna teža tretirane ribe (v gramih mokre teže) ob koncu/začetku očiščenja ([1])

Za druga zadevna razmerja *glej* (6). Morda je za oceno k_2 bolje uporabiti kompleksnejše modele, če lahko na primer najverjetneje pride do precejšnjega metabolizma (7) (8). Toda bolj kot je kompleksen model, previdneje je treba razlagati napovedi. Prisotnost nitro skupin lahko na primer kaže na hiter metabolizem, vendar ne vedno. Uporabnik mora torej pri načrtovanju študije pretehtati rezultate metode napovedovanja glede na kemijsko strukturo in druge pomembne informacije (na primer predhodne študije).

Čas, ki je potreben za doseganje določenega odstotka stacionarnega stanja, se lahko pridobi tako, da se uporabi ocena k_2 na podlagi splošne kinetične enačbe, ki opisuje absorpcijo in očiščenje (kinetika prvega reda), pri čemer se predvideva, da sta rast in metabolizem zanemarljiva. Če med študijo pride do precejšnje rasti, ocene, opisane v nadaljevanju, ne bodo zanesljive. V takih primerih je bolje uporabiti k_{2g}, popravljeno glede na rast, kot je opisano v nadaljevanju (glej oddelek 7 tega Dodatka):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[enačba A5.9]}$$

ali, če je C_w konstanten:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[enačba A5.10]}$$

Ko se koncentracija približa stacionarnemu stanju ($t \rightarrow \infty$), se lahko enačba A5.10 okrajša (*prim.* (9) (10)) na:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[enačba A5.11]}$$

ali

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[enačba A5.12]}$$

Potem je BKF × C_w približek koncentracije v ribi v stacionarnem stanju ($C_{f\text{-}SS}$). [Opomba: enak pristop se lahko uporabi za oceno stacionarnega BMF pri prehranskem preskusu. V tem primeru se v navedenih enačbah BKF nadomesti z BMF, C_w pa z C_{hrana}, koncentracija v hrani.]

Enačba A5.10 se lahko zapiše kot:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[enačba A5.13]}$$

ali

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[enačba A5.14]}$$

Ob uporabi enačbe A5.14 je mogoče napovedati čas, ki je potreben za doseganje določenega odstotka stacionarnega stanja, kadar se k_2 predhodno oceni z enačbo A5.5 ali A5.6.

Kot smernica se lahko upošteva, da je statistično optimalno trajanje faze absorpcije za pridobivanje statistično sprejemljivih podatkov (BKF_K) to obdobje, ki je potrebno, da krivulja logaritma koncentracije preskusne snovi

([1]) Teža ribe ob koncu faze absorpcije se lahko oceni na podlagi podatkov preteklih študij ali znanja o najverjetnejšem povečanju velikosti za preskusno vrsto na podlagi običajne teže ob začetku preskusa in običajnega trajanja absorpcije (npr. 28 dni).

▼M7

v ribi, grafično prikazana v odvisnosti od linearnega časa, doseže vsaj 50-odstotno stacionarno stanje (tj. $0{,}69/k_2$), ampak ne več kot 95-odstotno stacionarno stanje (tj. $3{,}0/k_2$) (11). Če kopičenje snovi doseže več kot 95-odstotno stacionarno stanje, postane izračun BKF_{SS} izvedljiv.

Čas, ki je potreben za doseganje 80-odstotnega stacionarnega stanja (z uporabo enačbe A5.14), je:

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[enačba A5.15]}$$

ali

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[enačba A5.16]}$$

In podobno, čas, ki je potreben za doseganje 95-odstotnega stacionarnega stanja, je:

$$t_{95} = \frac{-\,ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[enačba A5.17]}$$

Na primer trajanje faze absorpcije (tj. čas, da se doseže določen odstotek stacionarnega stanja, npr. t_{80} ali t_{95}) za preskusno snov z log K_{OW} = 4 bi znašalo (z uporabo enačbe A5.5, A5.16 in A5.17):

$$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ dni}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\ dneva(59ur)$$

$$\text{ali } t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ dneva(110ur)$$

Uporabi se lahko tudi izraz

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31\ (ur) \qquad \text{[enačba A5.18]}$$

za izračun časa, ki je potreben za doseganje dejanskega stacionarnega stanja (t_{eSS}) (12). Za preskusno snov z log K_{OW} = 4 je rezultat:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121\ ur$$

3. NAPOVED TRAJANJA FAZE OČIŠČENJA

Napoved časa, ki je potreben za zmanjšanje obremenitve telesa na določen odstotek začetne koncentracije, se tudi lahko pridobi s splošno enačbo, ki opisuje absorpcijo in očiščenje (ki sledita kinetiki prvega reda, prim. enačba A5.9 (1) (13).

Za fazo očiščenja se predvideva, da je C_w (ali C_{hrana} pri prehranskem preskusu) nič. Enačba se lahko nato okrajša na:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[enačba A5.19]}$$

ali

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[enačba A5.20]}$$

pri čemer je $C_{f,0}$ koncentracija na začetku faze očiščenja.

50-odstotno očiščenje bo nato doseženo v času (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ali

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

In podobno, 95-odstotno očiščenje bo doseženo v:

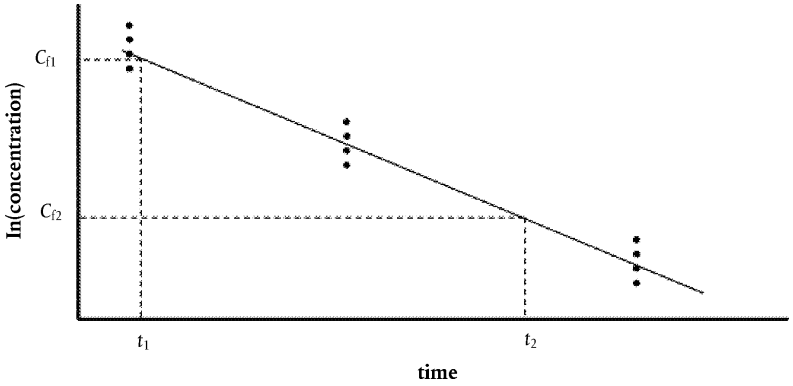
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Če se za prvo obdobje uporabi 80-odstotna absorpcija ($1{,}6/k_2$) in 95-odstotna izguba v fazi očiščenja ($3{,}0/k_2$), potem faza očiščenja traja približno dvakrat dlje kot faza absorpcije.

Opozoriti je treba, da ocene temeljijo na predvidevanju, da vzorca absorpcije in očiščenja sledita kinetiki prvega reda. Če kinetika prvega reda očitno ni upoštevana, te ocene niso veljavne.

4. ZAPOREDNA METODA: DOLOČITEV KONSTANTE HITROSTI OČIŠČENJA (IZGUBE) K_2

Za večino biokoncentracijskih podatkov se predvideva, da se „ustrezno“ opišejo s preprostim dvodelnim/dvoparametrskim modelom, kot je nakazano s premočrtno krivuljo, ki se približuje točkam za koncentracijo v ribah (na lestvici naravnega logaritma (ln)) med fazo očiščenja.



Opozoriti je treba, da lahko odstopanja od ravne linije kažejo na bolj zapleten vzorec očiščenja, kot je kinetika prvega reda. Za ugotavljanje vrst očiščenja, ki odstopajo od kinetike prvega reda, se lahko uporabi grafična metoda.

Za izračun k_2 za več časovnih točk (vzorčenja) se izvede linearna regresija ln(koncentracije) v odvisnosti od časa. Naklon regresijske premice je ocena konstante hitrosti očiščenja k_2 ([1]). Iz osnega odseka je preprosto izračunati povprečno koncentracijo v ribah na začetku faze očiščenja ($C_{0,d}$; ki je enaka povprečni koncentraciji v ribah ob koncu faze absorpcije (vključno z dovoljenimi stopnjami napake)) ([2]):

([1]) V večini programov, ki omogočajo linearno regresijo, je mogoče ugotoviti tudi standardne napake in interval zaupanja (CI, confidence interval) za ocene, npr. v Microsoft Excelu z uporabo zbirke orodij Analiza podatkov.

▼M7

$$C_{0,\ d} = e^{intercept} \qquad \text{[enačba A5.21]}$$

Za izračun k_2, ko sta na voljo samo dve časovni točki (vzorčenja) (kot pri minimiziranem načrtu), se nadomestita dve povprečni koncentraciji v naslednji enačbi

$$k_2 = \frac{\ln\,(C_{fl}) \;-\; \ln\,(C_{f2})}{t_{\,2} - t_{\,1}} \qquad \text{[enačba A5.22]}$$

pri čemer sta $\ln(C_{f1})$ in $\ln(C_{f2})$ naravna logaritma koncentracij v časovnih točkah t_1 in t_2, t_2 in t_1 pa sta časovni točki, ko sta bila odvzeta ta dva vzorca glede na začetek očiščenja ([1]).

5. ZAPOREDNA METODA: DOLOČITEV KONSTANTE HITROSTI ABSORPCIJE K_1 (SAMO ZA METODO VODNE IZPOSTAVLJENOSTI)

Za iskanje vrednosti k_1 na podlagi nabora podatkov o koncentracijah v zaporednih časovnih točkah za fazo absorpcije, se uporabi računalniški program, ki ustreza naslednjemu modelu:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[enačba A5.23]}$$

pri čemer se k_2 pridobi s prejšnjim izračunom, $C_f\,(t)$ in $C_w\,(t)$ pa sta koncentraciji v ribah oziroma vodi ob času t.

Za izračun k_1, ko sta na voljo samo dve časovni točki (vzorčenja) (kot pri minimiziranem načrtu), se uporabi naslednja enačba:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 \;-\; e^{-k_2 t})} \qquad \text{[enačba A5.24]}$$

pri čemer se k_2 pridobi s prejšnjim izračunom, C_f je koncentracija v ribah na začetku faze očiščenja, C_w pa je povprečna koncentracija v vodi med fazo absorpcije ([2]).

Vizualni pregled naklonov k_1 in k_2, ko sta konstanti grafično prikazani v odvisnosti od izmerjenih podatkov o točkah vzorčenja, se lahko uporabi za oceno prileganja podatkov. Če se izkaže, da je zaporedna metoda zagotovila slabo oceno za k_1, je za izračun k_1 in k_2 treba uporabiti sočasni pristop (glej naslednji oddelek 6). Pridobljene naklone je treba znova primerjati z grafičnim prikazom izmerjenih podatkov, da se vizualno pregleda prileganje podatkov. Če je prileganje podatkov še vedno slabo, lahko to pomeni, da fazi ne sledita kinetiki prvega reda in da je treba uporabiti kompleksnejše modele.

6. SOČASNA METODA ZA IZRAČUN KONSTANT HITROSTI ABSORPCIJE IN OČIŠČENJA (IZGUBE) (SAMO ZA METODO VODNE IZPOSTAVLJENOSTI)

Za ugotavljanje vrednosti k_1 in k_2 se lahko uporabijo računalniški programi na podlagi nabora podatkov o koncentracijah v zaporednih časovnih točkah in modela:

$$C_f = C_{\,w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[enačba A5.25]}$$

$$C_f = C_{\,w} \cdot \frac{k_1}{k_{\,2}} \cdot (e^{\,-k_2 (t - t_c)} \;- e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[enačba A5.26]}$$

pri čemer

t_c = čas ob koncu faze absorpcije.

Ta pristop neposredno zagotovi standardne napake za oceni k_1 in k_2. Kadar se k_1/k_2 nadomesti z BKF (prim. enačba A5.4) v enačbi A5.25 in A5.26, se

([1]) V nasprotju z metodo linearne regresije se s to enačbo ne pridobi standardne napake za k2.

([2]) V nasprotju s postopkom linearnega prilagajanja se s to metodo običajno ne pridobi standardne napake ali intervala zaupanja za oceno k1.

▼M7

lahko ocenita tudi standardna napaka in 95-odstotni interval zaupanja BKF. To je še zlasti uporabno, kadar se primerjajo različne ocene zaradi pretvorbe podatkov. Za odvisno spremenljivko (koncentracija v ribah) se lahko uporabi pretvorba v naravni logaritem ali ne, nato pa se lahko oceni negotovost BKF.

Ker je med parametroma k_1 in k_2 tesna povezava, če se ocenita sočasno, je morda priporočljivo najprej izračunati k_2 samo na podlagi podatkov o očiščenju (glej zgoraj); k_2 se v večini primerov lahko oceni na podlagi krivulje očiščenja z razmeroma visoko natančnostjo. k_1 se lahko nato izračuna na podlagi podatkov o absorpciji z nelinearno regresijo ([1]). Pri zaporednem prilagajanju je priporočeno uporabiti enako pretvorbo podatkov.

Vizualni pregled pridobljenih naklonov, ko sta grafično prikazana v odvisnosti od izmerjenih podatkov o točkah vzorčenja, se lahko uporabi za oceno prileganja podatkov. Če se izkaže, da je ta metoda zagotovila slabo oceno za k_1, se lahko za izračun k_1 in k_2 uporabi sočasni pristop. Prilagojeni model je treba znova primerjati z grafičnim prikazom izmerjenih podatkov, da se vizualno pregleda prileganje podatkov in pridobljene ocene parametrov za k_1, k_2 in dobljeni BKF, njihove standardne napake in/ali intervale zaupanja pa je treba primerjati z različnimi vrstami prileganja.

Če se podatki slabo prilegajo, lahko to pomeni, da fazi ne sledita kinetiki prvega reda in da je treba uporabiti kompleksnejše modele. Eden od najpogostejših zapletov je rast rib med preskusom.

7. POPRAVEK GLEDE NA RAZREDČITEV ZARADI RASTI ZA KINETIČNI BKF IN BMF

V tem oddelku je opisana standardna metoda za popravljanje vrednosti zaradi rasti rib med preskusom (ki se imenuje „razredčitev zaradi rasti“), ki je veljavna samo, kadar fazi sledita kinetiki prvega reda. Če se ugotovi, da fazi ne sledita kinetiki prvega reda, je za ustrezni popravek glede na razredčitev zaradi rasti priporočeno poiskati nasvet biostatistika ali uporabiti pristop, ki temelji na masi in je opisan v nadaljevanju.

V nekaterih primerih je za to metodo za popravljanje glede na razredčitev zaradi rasti značilno pomanjkanje natančnosti, včasih pa ne deluje (na primer za snovi, ki se očiščujejo zelo počasi in se preskušajo na ribah, ki hitro rastejo, je lahko izpeljana konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na razredčitev zaradi rasti, k_{2g}, zelo majhna, zato napaka v dveh konstantah rasti, ki se uporabita za njeno izpeljavo, postane ključnega pomena, v nekaterih primerih pa so lahko ocene k_g višje od k_2). V takih primerih se lahko uporabi drug pristop (tj. pristop, ki temelji na masi), ki deluje tudi takrat, ko snov ne sledi kinetiki rasti prvega reda, in ki odpravi potrebo po popravljanju. Ta pristop je opisan na koncu tega oddelka.

Metoda odštevanja s konstanto hitrosti rasti za popravljanje glede na rast

Pri standardni metodi se vsi podatki o posameznih težah in dolžinah pretvorijo v naravne logaritme, ln(teža) ali ln(1/teža) pa se grafično prikaže v odvisnosti od časa (dan) ločeno za tretirane in kontrolne skupine. Enak postopek se izvede ločeno za podatke o fazi absorpcije in očiščenja. Na splošno je za popravek glede na razredčitev zaradi rasti ustrezneje uporabiti podatke o teži iz celotne študije, da se izpelje konstanta hitrosti rasti (k_g), statistično značilne razlike med konstantama hitrosti rasti, izpeljanimi za fazo

([1]) Vedeti je treba, da se negotovost pri oceni k2 ne uporablja ustrezno pri bioakumulacijskem modelu, saj se v bistvu obravnava kot konstanta za prilagajanje k1 v metodi zaporednega prilagajanja. Pridobljena negotovost BKF je torej drugačna pri metodah sočasnega in zaporednega prilagajanja.

▼M7

absorpcije in očiščenja, pa lahko pokažejo, da je treba uporabiti konstanto hitrosti faze očiščenja. Skupne hitrosti rasti iz študij vodne izpostavljenosti za preskusne in kontrolne skupine se lahko uporabijo za preverjanje kakršnih koli učinkov, povezanih z tretiranjem.

Izračuna se linearna korelacija po metodi najmanjših kvadratov za ln(teža ribe) *v odvisnosti od* dneva (in za ln(1/teža) *v odvisnosti od* dneva) za vsako skupino (preskusna in kontrolna skupina, podatki o posameznih ribah in ne dnevne povprečne vrednosti) za celotno študijo, za fazo absorpcije in očiščenja, pri čemer se uporabijo standardni statistični postopki. Izračunajo se variance v naklonih črt in uporabijo za ovrednotenje statistične značilnosti (p = 0,05) razlike v naklonih (konstanti hitrosti rasti) s Studentovim t-testom (ali analizo variance, če se preskuša več koncentracij). Za namene popravljanja glede na rast se po možnosti uporabijo podatki o teži. Podatki o dolžini, obdelani enako, so lahko uporabni za primerjanje kontrolne in preskusne skupine, da se preverijo učinki, povezani s tretiranjem. Če ni statistično značilne razlike v analizi podatkov o teži, se lahko združijo preskusni in kontrolni podatki ter izračuna skupna konstanta hitrosti rasti rib za študijo (k_g) kot skupni naklon linearne korelacije. Če se ugotovijo statistično značilne razlike, se konstante hitrosti rasti za vsako skupino rib in/ali fazo študije navedejo ločeno. Konstanto hitrosti za vsako tretirano skupino je nato treba uporabiti za namene popravljanja glede na razredčitev zaradi rasti za to skupino. Če so bile opažene statistične razlike med konstantama hitrosti absorpcije in očiščenja, je treba uporabiti konstante hitrosti, izpeljane iz faze očiščenja.

Izračunano konstanto hitrosti rasti (k_g, izraženo z dan^{-1}) se lahko odšteje od skupne konstante hitrosti očiščenja (k_2), da se dobi konstanta hitrosti očiščenja, k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[enačba A5.27]}$$

Konstanto hitrosti absorpcije se deli s konstanto hitrosti očiščenja, popravljeno glede na rast, da se dobi kinetični BKF, popravljen glede na rast, ki se izrazi z BKF_{Kg} (ali BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[enačba A5.28]}$$

Konstanta hitrosti rasti, izpeljana za prehransko študijo, se uporabi v enačbi A7.5 za izračun BMF_{Kg}, popravljenega glede na rast (prim. Dodatek 7).

Metoda, ki temelji na masi, za popravljanje glede na rast

Metoda, ki nadomešča že opisano „metodo odštevanja s konstanto hitrosti rast“ in odpravlja potrebo po popravljanju na podlagi rasti, se lahko uporabi, kot je opisano v nadaljevanju. Po tem načelu se namesto koncentracije uporabijo podatki o očiščenju glede na maso cele ribe.

Koncentracije v tkivu iz faze očiščenja (masa preskusne snovi/masna enota ribe) se pretvorijo v maso preskusne snovi/riba: koncentracije in teže posameznih rib se povežejo v preglednici (npr. z računalniškim programom za obdelavo preglednic) in vsaka koncentracija se pomnoži s skupno težo ribe za to meritev, da se pridobi nabor mas preskusne snovi/riba za vse vzorce iz faze očiščenja.

Dobljeni naravni logaritem podatkov o masi snovi se grafično prikaže v odvisnosti od časa za preskus (faza očiščenja), kot običajno.

▼M7

Za metodo vodne izpostavljenosti se kot običajno izpelje konstanta hitrosti absorpcije (glej oddelke 4 in 6) (opozoriti je treba, da je treba uporabiti „normalno“ vrednost k_2 v enačbah za prilagajanje krivulje za k_1), iz navedenih podatkov pa se izpelje konstanta hitrosti očiščenja. Ker je dobljena vrednost za konstanto hitrosti očiščenja neodvisna od rasti, saj je bila izpeljana glede na maso cele ribe, jo je treba poimenovati k_{2g} in ne k_2.

8. NORMALIZACIJA LIPIDOV NA 5-ODSTOTNO VSEBNOST LIPIDOV (SAMO ZA METODO VODNE IZPOSTAVLJENOSTI)

V poročilu je treba navesti tudi rezultate (kinetičnega in stacionarnega) BKF iz preskusa vodne izpostavljenosti glede na privzeto vsebnost lipidov v ribah, ki znaša 5 % mokre teže, razen če je mogoče utemeljiti, da se preskusna snov primarno ne kopiči v lipidih (npr. nekatere perfluorirane snovi se lahko vežejo na proteine). Podatke o koncentraciji v ribah ali BKF je treba pretvoriti glede na 5-odstotno vsebnost lipidov na mokro težo. Če so bile za meritve koncentracije snovi in vsebnosti lipidov v vseh točkah vzorčenja uporabljene iste ribe, je treba vsako posamezno izmerjeno koncentracijo v ribi popraviti glede na vsebnost lipidov v tej ribi.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[enačba A5.29]}$$

pri čemer

$C_{f,L}$ = koncentracija v ribi, normalizirana glede na lipide (mg kg^{-1} mokra teža)

L = delež lipidov (glede na mokro težo)

C_f = koncentracija preskusne snovi v ribah (mg kg^{-1} mokra teža)

Če analiza lipidov ni bila izvedena na vseh vzorčenih ribah, se za normalizacijo BKF uporabi povprečna vrednost lipidov. Za stacionarni BKF je treba uporabiti povprečno vrednost, zabeleženo ob koncu faze absorpcije v tretirani skupini. Za normalizacijo kinetičnega BKF je v nekaterih primerih morda bolje uporabiti drugačen pristop, na primer če se je med fazo absorpcije ali očiščenja vsebnost lipidov precej spremenila. V vsakem primeru pa je treba vedno uporabiti stopnjo hranjenja, ki čim bolj zmanjša velike spremembe v vsebnosti lipidov.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[enačba A5.30]}$$

pri čemer

BKF_{KL} = kinetični BKF, normaliziran glede na lipide (L kg^{-1})

L_n = povprečni delež lipidov (glede na mokro težo)

BKF_K = kinetični BKF (L kg^{-1})

VIRI

(1) Arnot J. A. in Gobas F. A. P. C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(2) Poglavje C.20 te priloge, *Preskus razmnoževanja vrste Daphnia magna*.

(3) Spacie A. in Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. in Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. in Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Danska.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. in Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Na voljo na: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. in Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, ZDA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. in Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. in Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. in van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Dodatek 6

ODDELEK Z ENAČBAMI ZA PRESKUS VODNE IZPOSTAVLJENOSTI: MINIMIZIRAN NAČRT PRESKUSA

Razlog za ta pristop je, da se lahko biokoncentracijski faktor v popolnem preskusu določi kot stacionarni biokoncentracijski faktor (BKF_{SS}), tako da se izračuna razmerje med koncentracijo preskusne snovi v ribjem tkivu in koncentracijo preskusne snovi v vodi, ali z izračunom kinetičnega biokoncentracijskega faktorja (BKF_K), ki je razmerje med konstanto hitrosti absorpcije k_1 in konstanto hitrosti očiščenja k_2. BKF_K je veljaven, čeprav med absorpcijo ni dosežena stacionarna koncentracija snovi, če absorpcija in očiščenje približno sledita kinetičnim procesom prvega reda.

Če se meritev koncentracije snovi v tkivih (C_{f1}) opravi ob koncu izpostavljenosti (t_1) in se koncentracija v tkivu (C_{f2}) znova izmeri po določenem časovnem obdobju (t_2), se lahko konstanta hitrosti očiščenja (k_2) oceni z enačbo A5.22 iz Dodatka 5.

Konstanta hitrosti absorpcije, k_1, se lahko nato določi algebrsko z enačbo A5.23 iz Dodatka 5 (pri čemer je C_f enak C_{f1}, t pa je enak t_1) (1). Kinetični biokoncentracijski faktor za minimiziran načrt preskusa (ki se imenuje BKF_{Km}, da ga je mogoče ločiti od kinetičnih biokoncentracijskih faktorjev, ki se določajo z drugimi metodami) je torej:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[enačba A6.1]}$$

Koncentracije ali rezultate je treba popraviti glede na razredčitev zaradi rasti in normalizirati na 5-odstotno vsebnost lipidov v ribah, kot je opisano v Dodatku 5.

Minimiziran BKF_{SS} je BKF, izračunan ob koncu faze absorpcije ob predvidevanju, da je bilo doseženo stacionarno stanje. To je mogoče zgolj predvidevati, saj število točk vzorčenja ni zadostno, da se lahko dokaže.

$$\text{minimiziraniBCF}_{SS} = \frac{C_{f\,-minSS}}{C_{w\,-minSS}} \qquad \text{[enačba A6.2]}$$

pri čemer

$C_{f\text{-}minSS}$ = koncentracija v ribah ob predvidenem stacionarnem stanju na koncu absorpcije (mg kg^{-1} mokra teža).

$C_{w\text{-}minSS}$ = koncentracija v vodi ob predvidenem stacionarnem stanju na koncu absorpcije (mg l^{-1}).

VIRI

(1) Springer T. A., Guiney P. D., Krueger H. O. in Jaber M. J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

▼M7

Dodatek 7

ODDELEK Z ENAČBAMI ZA PRESKUS PREHRANSKE IZPOSTAVLJENOSTI:

1. Primer količin za sestavine ustrezne ribje hrane, dostopne na trgu

2. Primeri tehnik dodajanja snovi v hrano

3. Izračun učinkovitosti asimilacije in biomagnifikacijskega faktorja

4. Popravljanje glede na lipide

5. Vrednotenje razlik med izmerjeno koncentracijo ob času nič ($C_{0,m}$) in izpeljano koncentracijo ob času nič ($C_{0,d}$)

6. Smernice za preskusne snovi, ki se očiščujejo zelo hitro

1. PRIMER KOLIČIN ZA SESTAVINE USTREZNE RIBJE HRANE, DOSTOPNE NA TRGU

glavna sestavina	ribja moka
surove beljakovine	≤ 55,0 %
surove maščobe	≤ 15,0 % [1]
surove vlaknine	≥ 2,0 %
vlaga	≥ 12 %
pepel	≥ 8 %

[1] Na nekaterih območjih je morda dostopna samo ribja hrana s koncentracijo lipidov, ki je veliko nižja od te zgornje meje. V takih primerih je treba študije primerov izvesti s to nižjo koncentracijo lipidov v hrani, ki je bila dostopna, in ustrezno prilagoditi stopnjo hranjenja za ohranjanje zdravja rib. Lipidov v hrani se ne sme umetno povečati z dodajanjem odvečnega olja.

2. PRIMERI TEHNIK DODAJANJA SNOVI V HRANO

Splošne točke

Kontrolna hrana mora biti pripravljena na povsem enak način kot hrana z dodatkom, vendar brez preskusne snovi.

Za preverjanje koncentracije tretirane hrane je treba ekstrahirati tri vzorce odmerjene hrane z ustrezno metodo ekstrakcije in izmeriti koncentracijo preskusne snovi ali radioaktivnost v ekstraktih. Dokazati je treba visoke analitske izkoristke (> 85 %) z majhnimi razlikami med vzorci (tri koncentracije vzorcev snovi, vzetih ob začetku preskusa, ne smejo odstopati več kot ± 15 % od povprečja).

Med prehranskim preskusom je treba zbrati tri vzorce hrane za analizo na dan 0 in ob koncu faze absorpcije, da se določi vsebnost preskusne snovi v hrani.

Priprava ribje hrane s (čistim) tekočim preskusnim materialom

Določi se ciljna, nominalna preskusna koncentracija v tretirani ribji hrani, na primer 500 μg preskusne snovi/g hrana. Doda se ustrezna količina (molska masa ali določena radioaktivnost) čiste preskusne snovi k znani masi ribje hrane v steklenem kozarcu ali rotacijski uparjalni bučki. Masa ribje hrane mora biti zadostna za trajanje faze absorpcije (ob upoštevanju potrebe po naraščajočih količinah za vsako hranjenje zaradi rasti rib). Ribja hrana/preskusna snov se mora čez noč mešati s počasnim prevračanjem (npr. z mešalno

▼M7

napravo z rotacijskim stojalom ali z rotacijo, če se uporabi rotacijska uparjalna bučka). Hrano z dodatkom je treba do uporabe shranjevati pod pogoji, ki ohranjajo obstojnost preskusne snovi v mešanici hrane (npr. hlajenje).

Priprava ribje hrane z vehiklom v obliki koruznega ali ribjega olja

Trdne preskusne snovi je treba zmleti v terilnici v fin prah. Tekoče preskusne snovi se lahko dodajo neposredno v koruzno ali ribje olje. Preskusna snov se raztopi v znani količini koruznega ali ribjega olja (npr. 5–15 ml). Odmerjeno olje se količinsko prenese v rotacijsko uparjalno bučko ustrezne velikosti. Bučko, v kateri je bilo pripravljeno odmerjeno olje, je treba sprati z dvema majhnima enakima količinama olja in ju dodati v rotacijsko uparjalno bučko, da se zagotovi prenos celotne raztopljene preskusne snovi. Za zagotovitev popolne raztopljenosti/razpršitve v olju (ali če se v študiji uporablja več preskusnih snovi) se doda mikromešalnik, bučka se zamaši in zmes se čez noč hitro meša. V bučko se doda ustrezna količina ribje hrane (običajno v obliki peletov) za preskus in vsebina bučke se enakomerno zmeša z neprestanim obračanjem steklene bučke vsaj 30 minut, po možnosti pa čez noč. Potem se hrana z dodatkom ustrezno shrani (npr. da na hladno), da se zagotovi obstojnost preskusne snovi v hrani do uporabe.

Priprava ribje hrane z organskim topilom

Ustrezna količina preskusne snovi (molska masa ali določena radioaktivnost), ki je zadostna, da se doseže ciljni odmerek, se raztopi v ustreznem organskem topilu (npr. cikloheksan ali aceton; 10–40 ml ali po potrebi več glede na količino hrane, ki ji je treba dodati preskusno snov). Del te raztopine ali vsa raztopina (ki se doda glede na odmerek) se zmeša z ustrezno maso ribje hrane, ki je zadostna, da se doseže zahtevani nominalni odmerek v preskusu. Hrana/preskusna snov se lahko zmeša v posodi za mešanje iz nerjavnega jekla in sveže odmerjena ribja hrana se dva dni pusti v posodi v laboratorijskem digestoriju (in se občasno zmeša), da izhlapi odvečno topilo, ali pa se zmeša v rotacijski uparjalni bučki z neprestanim vrtenjem. Odvečno topilo se lahko po potrebi „odpihne“ s tokom zraka ali dušika. Skrbno je treba zagotoviti, da preskusna snov med odstranjevanjem topila ne kristalizira. Hrano z dodatkom je treba shranjevati pod pogoji (npr. hlajenje), ki ohranjajo obstojnost preskusne snovi v mešanici hrane do uporabe.

3. IZRAČUN UČINKOVITOSTI ASIMILACIJE IN BIOMAGNIFIKACIJSKEGA FAKTORJA

Za izračun učinkovitosti asimilacije je treba najprej oceniti skupno konstanto hitrosti očiščenja v skladu z oddelkom 4 iz Dodatka 5 (z „zaporedno metodo“, tj. standardno linearno regresijo), pri čemer se uporabijo povprečne koncentracije vzorcev iz faze očiščenja. Konstanta stopnje hranjenja, I, in trajanje absorpcije, t, sta znana parametra študije. C_{hrana}, povprečna izmerjena koncentracija preskusne snovi v hrani, je izmerjena spremenljivka v študiji. $C_{0,\text{d}}$, koncentracija preskusne snovi v ribah ob koncu faze absorpcije, se običajno izpelje iz osnega odseka v grafičnem prikazu ln(koncentracije) *v odvisnosti od* dneva očiščenja.

Učinkovitost asimilacije snovi (a, absorpcija preskusne snovi v črevesju) se izračuna kot:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{hrana}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[enačba A7.1]}$$

pri čemer

$C_{0,d}$ = izpeljana koncentracija v ribah ob času nič faze očiščenja (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = skupna konstanta hitrosti očiščenja (ki ni popravljena glede na rast) (dan^{-1}), izračunana z enačbami iz Dodatka 5, oddelek 3;

I = konstanta hitrosti zaužitja hrane (g hrana g^{-1} riba dan^{-1});

C_{hrana} = koncentracija v hrani (mg kg^{-1} hrana);

t = trajanje obdobja hranjenja (dan)

Morda pa je treba prilagoditi stopnjo hranjenja, I, ki se uporabi pri izračunu, glede na rast rib, da se pridobi točna učinkovitost asimilacije, a. Pri preskusu, v katerem ribe precej rastejo med fazo absorpcije (količine hrane, da bi se ohranila določena stopnja hranjenja, pa se med to fazo ne prilagodijo), je dejanska stopnja hranjenja ob nadaljevanju faze absorpcije nižja kot ta, ki je bila določena, kar pomeni višjo „dejansko“ učinkovitost asimilacije. (Opozoriti je treba, da to ni pomembno za skupni izračun BMF, saj se parametri I dejansko izničijo v enačbi A7.1 in A7.4). Povprečna stopnja hranjenja, popravljena glede na razredčitev zaradi rasti, I_g, se lahko izpelje na več načinov, ampak najbolj enostaven in natančen je ta, pri katerem se uporabi znana konstanta hitrosti rasti (k_g), da se ocenijo teže preskusnih rib v časovnih točkah med fazo absorpcije, *tj.*:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[enačba A7.2]}$$

pri čemer

$W_f(t)$ = povprečna teža ribe na dan absorpcije t

$W_{f,0}$ = povprečna teža ribe na začetku preskusa

Na ta način se lahko oceni (vsaj) povprečna teža rib na zadnji dan izpostavljenosti ($W_{f,konec\ absorpcije}$). Ker je bila stopnja hranjenja določena glede na $W_{f,0}$, se lahko dejanska stopnja hranjenja za vsak dan absorpcije izračuna s tema dvema vrednostma teže. Stopnja hranjenja, popravljena glede na rast, I_g (g hrana g^{-1} riba dan^{-1}), ki se uporabi namesto I v primerih hitre rasti med fazo absorpcije, se lahko nato izračuna kot

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,konec\ absorpcije}} \qquad \text{[enačba A7.3]}$$

Ko se pridobi učinkovitost asimilacije, se lahko izračuna BMF, tako da se jo pomnoži s konstanto stopnje hranjenja I (ali I_g, če se je uporabila za izračun α) in deli produkt s skupno konstanto hitrosti očiščenja, k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[enačba A7.4]}$$

Na enak način je treba izračunati tudi biomagnifikacijski faktor, popravljen glede na rast, tako da se uporabi konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (kot je izpeljana v oddelku 7 iz Dodatka 5). Če je bila I_g uporabljena za izračun α, jo je treba uporabiti tudi tukaj namesto I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[enačba A7.5]}$$

pri čemer

α = učinkovitost asimilacije (absorpcija preskusne snovi v črevesju);

k_2 = skupna konstanta hitrosti očiščenja (ki ni popravljena glede na rast) (dan^{-1}), izračunana z enačbami iz Dodatka 5, oddelek 3;

▼M7

k_{2g} = konstanta hitrosti očiščenja, popravljena glede na rast (dan^{-1});

I = konstanta hitrosti zaužitja hrane (g hrana g^{-1} riba dan^{-1});

Razpolovna doba ($t_{1/2}$), popravljena glede na rast, se izračuna z naslednjo enačbo:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[enačba A7.6]}$$

Učinkovitost asimilacije snovi iz hrane se lahko tudi oceni, če se določijo ostanki v tkivih med linearno fazo faze absorpcije (med prvim in tretjim dnevom). V tem primeru se lahko učinkovitost asimilacije snovi (α) določi z naslednjo enačbo:

$$\alpha = \frac{C_{riba}(t)}{I \times C_{hrana} \times t} \qquad \text{[enačba A7.7]}$$

pri čemer

C_{riba} *(t)* = koncentracija preskusne snovi v ribi ob času t (mg kg^{-1} mokra teža).

4. POPRAVLJANJE GLEDE NA LIPIDE

Če je bila vsebnost lipidov izmerjena v istih ribah, na katerih je bila izvedena tudi kemijska analiza za vse intervale vzorčenja, je treba posamezne koncentracije popraviti glede na lipide, ln(koncentracija, popravljena glede na lipide) pa se grafično prikaže v odvisnosti od očiščenja (dan), da se pridobita $C_{0,\text{d}}$ in k_2. Učinkovitost asimilacije (enačba A7.1) se lahko nato izračuna glede na lipide, pri čemer se uporabi C_{hrana} glede na lipide (tj. C_{riba} se pomnoži s povprečnim deležem lipidov v hrani). Nato se z izračunom na podlagi enačb A7.4 in A7.5 neposredno pridobi BMF, popravljen glede na lipide (in razredčitev zaradi rasti).

V nasprotnem primeru se povprečni delež lipidov (masni delež) v ribah in hrani izpelje za tretirano in kontrolno skupino (za hrano in kontrolno skupino rib je to običajno na podlagi podatkov, izmerjenih ob začetku in koncu izpostavljenosti; za tretirano skupino rib je to običajno na podlagi podatkov, izmerjenih samo ob koncu izpostavljenosti). V nekaterih študijah se lahko vsebnost lipidov v ribah precej poveča; v takih primerih je ustrezneje uporabiti povprečno koncentracijo lipidov v preskusnih ribah, ki se izračuna iz izmerjenih vrednosti ob koncu izpostavljenosti in na začetku očiščenja. Na splošno je podatke iz tretirane skupine treba uporabiti samo za izpeljavo obeh deležev lipidov.

Korekcijski faktor za lipide (L_c) se izračuna kot:

$$L_C = \frac{L_{riba}}{L_{hrana}} \qquad \text{[enačba A7.8]}$$

pri čemer sta L_{riba} in L_{hrana} povprečna deleža lipidov v ribah oziroma hrani.

Korekcijski faktor za lipide se uporabi za izračun biomagnifikacijskega faktorja, popravljenega glede na lipide (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[enačba A7.9]}$$

5. VREDNOTENJE RAZLIK MED IZMERJENO KONCENTRACIJO OB ČASU NIČ ($C_{0,\text{M}}$) IN IZPELJANO KONCENTRACIJO OB ČASU NIČ ($C_{0,\text{D}}$)

Primerjati je treba izmerjeno koncentracijo ob času nič ($C_{0,\text{m}}$) in izpeljano koncentracijo ob času nič ($C_{0,\text{d}}$). Če sta si zelo podobni, to podpre model prvega reda, ki je bil uporabljen za izpeljavo parametrov očiščenja.

▼M7

V nekaterih študijah se lahko ugotovi precejšnja razlika med izpeljano vrednostjo ob času nič, $C_{0,d}$, in povprečno izmerjeno koncentracijo ob času nič. $C_{0,m}$ (glej zadnjo alinejo odstavka 159 te preskusne metode). Če je $C_{0,d}$ veliko nižja od $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), lahko razlika kaže na prisotnost neprebavljene hrane z dodatkom v črevesju. To je mogoče ugotoviti s preskušanjem, tako da se izvede ločena analiza na odstranjenem črevesju, če so bili vzeti dodatni vzorci (celih rib) in shranjeni ob koncu faze absorpcije. V nasprotnem primeru, če statistično veljaven preskus osamelcev, uporabljen za linearno regresijo faze očiščenja, kaže, da je prva točka vzorčenja očiščenja lažno višja, je morda ustrezno izvesti linearno regresijo za izpeljavo k_2, ampak pri tem izpustiti prvo točko koncentracije očiščenja. V takih primerih, kadar se negotovost linearne regresije znatno zmanjša in je jasno, da je bila približno upoštevana kinetika očiščenja prvega reda, je morda ustrezno uporabiti dobljeni vrednosti $C_{0,d}$ in k_2 pri izračunu asimilacije učinkovitosti. To je treba v celoti utemeljiti v poročilu. Mogoče je tudi, da je faza očiščenja sledila kinetiki, ki ni prvega reda. Če je najverjetneje sledila taki kinetiki (tj. podatki, pretvorjeni v naravni logaritem, na videz sledijo krivulji v primerjavi s prikazom premice linearne regresije), potem izračuni k_2 in $C_{0,d}$ najverjetneje niso veljavni in treba je poiskati nasveti biostatistika.

Če je $C_{0,d}$ veliko višja od izmerjene vrednosti ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), lahko to pomeni, da: se je snov zelo hitro očistila (tj. točke vzorčenja so se približale meji določljivosti analitske metode zelo zgodaj v fazi očiščenja, *prim.* oddelek 6 v nadaljevanju); je prišlo do odstopanja od kinetike očiščenja prvega reda; je linearna regresija, s katero sta se izpeljali k_2 in $C_{0,d}$, napačna; ali pa je nekaterih časovnih točkah vzorčenja prišlo do težave z izmerjenimi koncentracijami v študiji. V takih primerih je treba skrbno proučiti prikaz linearne regresije za dokaze o vzorcih, ki so na meji določljivosti ali blizu nje, za osamelce in očitne krivine (ki kažejo na kinetiko, ki ni prvega reda) ter jih poudariti v poročilu. Opisati in utemeljiti je treba kakršno koli nadaljnjo ponovno vrednotenje linearne regresije za izboljšanje ocenjenih vrednosti. Če je ugotovljeno znatno odstopanje od kinetike prvega reda, izračuni k_2 in $C_{0,d}$ najverjetneje ne bodo veljavni in treba je poiskati nasvet biostatistika.

6. SMERNICE ZA PRESKUSNE SNOVI, KI SE OČIŠČUJEJO ZELO HITRO

Kot je bilo opisano v odstavku 129 te preskusne metode, se lahko nekatere snovi očiščujejo tako hitro, da ni mogoče izpeljati zanesljive koncentracije ob času nič, $C_{0,d}$, in k_2, saj se v vzorcih, vzetih zelo zgodaj v fazi očiščenja (tj. od drugega vzorca očiščenja naprej), snov dejansko ne meri več (navedene koncentracije so na meji določljivosti). Ta situacija je bila ugotovljena v krožnem preskusu, ki je bil izveden v podporo tej preskusni metodi z benzo[a]pirenom in naveden v validacijskem poročilu za metodo. V takih primerih ni mogoče zanesljivo izvesti linearne regresije, s katero bi se najverjetneje dobila nerealno visoka ocena $C_{0,d}$, s tem pa navidezna učinkovitost asimilacije, ki bi znašala veliko več kot 1. V teh primerih se lahko izračuna previdna ocena k_2 in BMF „zgornje meje“.

Če se uporabijo podatkovne točke faze očiščenja, ko je bila izmerjena koncentracija, do in vključno s prvo „nezaznavno“ koncentracijo (koncentracija, določena na meji določljivosti), se lahko z linearno regresijo (pri kateri se uporabijo podatki o koncentraciji, pretvorjeni v naravni logaritem, v odvisnosti od časa) dobi ocena k_2. Take vrste primerov bodo verjetno zajele samo dve podatkovni točki (npr. prvi in drugi dan vzorčenja med fazo očiščenja), nato pa se lahko oceni k_2 z enačbo A5.22 iz Dodatka 5. Ta ocena k_2 se lahko uporabi za oceno učinkovitosti asimilacije z enačbo A7.1, pri čemer se vrednost $C_{0,d}$ v enačbi nadomesti z izmerjeno koncentracijo ob

▼**M7**

času nič ($C_{0,m}$) v primerih, ko je ocena $C_{0,d}$ očitno veliko višja od te, ki bi se lahko dosegla v preskusu. Če $C_{0,m}$ ni bilo mogoče izmeriti, je treba uporabiti mejo zaznavnosti v ribjem tkivu. Če se s tem v nekaterih primerih dobi vrednost $\alpha > 1$, se v „najslabšem primeru“ predvideva, da učinkovitost asimilacije znaša 1.

Nato se lahko oceni največji BMF_K z enačbo A7.4, navesti pa ga je treba kot vrednost „ki je veliko manjša od“ (<<). Na primer za študijo, ki je izvedena s 3-odstotno stopnjo hranjenja, razpolovno dobo očiščenja, ki znaša manj kot tri dni, in vrednostjo α, ki je „najslabšem primeru“ enaka 1, bo vrednost BMF_K verjetno znašala manj kot 0,13. Zaradi namena take ocene in dejstva, da bodo ocene vrednosti same po sebi previdne, teh vrednosti ni treba popraviti glede na rast, razredčitev ali vsebnost lipidov hrani in ribah.

▼M7

Dodatek 8

PRISTOPI K OCENJEVANJU OKVIRNIH BKF NA PODLAGI PODATKOV, ZBRANIH V ŠTUDIJI PREHRANSKE IZPOSTAVLJENOSTI

Prehranska metoda je vključena v to preskusno metodo za preskušanje bioakumulacije snovi, ki je v praksi ni mogoče preskusiti z metodo vodne izpostavljenosti. Z metodo vodne izpostavljenosti se dobi biokoncentracijski faktor, pri prehranski metodi pa se neposredno dobijo informacije o potencialu za biomagnifikacijo pri hranjenju. V mnogih sistemih za kemijsko varnost se zahtevajo informacije o vodni biokoncentraciji (na primer pri oceni tveganja in Globalno usklajenem sistemu za razvrščanje). Zato je treba uporabiti podatke iz prehranske študije za oceno biokoncentracijskega faktorja, ki je primerljiv s preskusi, izvedenimi v skladu z metodo vodne izpostavljenosti ([1]). V tem oddelku so opisani pristopi, ki jim je mogoče slediti v ta namen, navedene pa so tudi pomanjkljivosti, ki so del ocen.

V prehranski študiji se izmeri očiščenje, da se dobi konstanta hitrosti očiščenja, k_2. Če se lahko na podlagi razpoložljivih podatkov za situacijo, ko so ribe bile izpostavljene preskusni snovi prek vode, oceni konstanta hitrosti absorpcije, se lahko oceni tudi kinetični BKF.

Ocena konstante hitrosti absorpcije za vodno izpostavljenost preskusne snovi temelji na mnogih domnevah, vse te domneve pa prispevajo k negotovosti ocene. Poleg tega se s tem pristopom k oceni BKF predvideva, da je skupna hitrost očiščenja (vključno z dejavniki, ki k njej prispevajo, na primer porazdelitev v telesu in posamezni procesi očiščenja) neodvisna od tehnike izpostavljenosti, ki se uporabi za obremenitev telesa s preskusno snovjo.

Glavne domneve, ki so del pristopa k ocenjevanju, je mogoče povzeti na naslednji način:

očiščenje, ki sledi prehranski absorpciji, je enako očiščenju, ki sledi vodni izpostavljenosti za dano snov;

absorpcija iz vode bi sledila kinetiki prvega reda;

glede na metodo, ki se uporabi za oceno absorpcije:

— se lahko absorpcijo poveže samo s težo rib;

— se lahko absorpcijo poveže samo s porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda za snov;

— se lahko absorpcijo poveže s kombinacijo teže rib in porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda za snov;

— dejavniki, ki lahko v praksi vplivajo na absorpcijo pri študiji vodne izpostavljenosti, na primer biološka dostopnost snovi, adsorpcija na opremo, molekulska velikost itd., imajo majhen učinek;

— in, kar je ključno:

zbirka podatkov („nabor za usposabljanje“), ki je bila uporabljena za razvoj metode za ocenjevanje absorpcije, je reprezentativna za preiskovano snov.

V več javno dostopnih publikacijah so bile izpeljane enačbe, ki povezujejo absorpcijo iz vode v ribe prek škrg s porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda za snov, težo rib (1), (2), (3) in (4), prostornino in/ali vsebnostjo lipidov, permeacijo/difuzijo skozi membrano (5), (6), volumnom dihanja rib (7) in s pristopom fugativnosti/masne bilance (8), (9) in (10). Podroben opis takih

([1]) V naravi pot, ki pomeni največjo izpostavljenost v vodnih okoljih, za zelo hidrofobne snovi najverjetneje poteka prek zaužitja, zato ocenjeni BKF ne predstavlja nujno bioakumulacijski potencial take snovi.

▼M7

metod v tem okviru je zajet v Crookes & Brooke (11). Barberjeva publikacija (12), ki se je usmerila v izdelavo modelov za bioakumulacijo na podlagi prehranske absorpcije, je tudi uporabna v tem okviru, saj zajema prispevke na podlagi modelov za hitrost absorpcije prek škrg. Ta vidik je opisan tudi v oddelku referenčnega dokumenta k prehranskem protokolu iz leta 2004 (13).

Zdi se, da je večina teh modelov bila izpeljana z uporabo omejene zbirke podatkov. Za modele, pri katerih so na voljo podrobnosti o zbirki podatkov, uporabljeni za izdelavo modela, se zdi, da so vrste uporabljenih snovi pogosto podobne strukture ali razreda (v smislu funkcionalnosti, npr. organoklorne spojine). To prispeva k negotovosti pri uporabi modela za napovedovanje konstante hitrosti absorpcije za drugačno vrsto snovi, poleg drugih vidikov v zvezi s preskusom, kot so vrsta, temperatura itd.

V pregledu tehnik, ki so na voljo (11), je bilo poudarjeno, da ne obstaja metoda, ki bi bila „ustreznejša“ kot druge. Zato je treba jasno utemeljiti uporabljeni model. Kadar je na voljo več metod in je njihovo uporabo mogoče utemeljiti, je morda smotrno predstaviti več ocen k_1 (in s tem BKF) ali območje vrednosti k_1 (in BKF) v skladu z več metodami za ocenjevanje absorpcije. Zaradi razlik v vrstah modelov in zbirkah podatkov, uporabljenih za razvoj teh modelov, pa ne bi bilo ustrezno uporabiti povprečne vrednosti ocen, izpeljanih na različne načine.

Nekateri raziskovalci so predpostavili, da je treba ocene BKF te vrste popraviti glede na biološko dostopnost, da se upošteva adsorpcija snovi na raztopljeni organski ogljik pod pogoji vodne izpostavljenosti, in jih uskladiti z rezultati iz študij vodne izpostavljenosti (npr. (13) in (14)). Vendar ta popravek morda ni ustrezen zaradi nizkih ravni raztopljenega organske ogljika, ki so zahtevane pri študiji vodne izpostavljenosti za oceno v „najslabšem primeru“ (tj. razmerje med biološko dostopnostjo snovi in snovjo, izmerjeno v raztopini). Za močno hidrofobne snovi lahko postane absorpcija prek škrg omejena zaradi hitrosti pasivne difuzije blizu površine škrg; v tem primeru je mogoče, da se pri popravku upošteva ta učinek, ne pa ta, za katerega je bil zasnovan.

Priporočeno se je usmeriti v metode, ki zahtevajo parametre, za katere bodo na voljo podatki o preiskovani snoveh v skladu s tukaj opisano prehransko študijo (tj. log K_{OW}, teža ribe). Uporabijo se lahko druge metode, ki zahtevajo kompleksnejše podatke, ampak morda bo treba opraviti dodatne meritve v preskusu ali pridobiti podrobno znanje o preskusni snovi ali vrsti rib, ki mogoče ni splošno dostopno. Poleg tega lahko na izbiro modela vpliva raven validacije in področje uporabe (glej (11) za pregled in primerjavo različnih metod).

Upoštevati je treba, da sta dobljeni oceni k_1 in BKF negotovi ter da jih je morda treba obravnavati s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov, skupaj z izpeljanim BMF in parametri snovi (npr. molekulsko velikostjo), da se pridobi celoten pregled bioakumulacijskega potenciala snovi. Razlaga in uporaba teh parametrov je morda odvisna od regulativnega okvira.

VIRI

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. in Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. in Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. in Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼**M7**

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, ZDA: 304-315.

(6) Arnot J.A. in Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. in Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. in Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. in Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. in Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, Združeno kraljestvo.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonimni avtor (2004), Background document to the fish dietary study protocol, dokument oddan TC-NES WG o PBT.

(14) Gobas F. in Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, ZDA: 189-231.

▼B

C.14 PRESKUS RASTI RIBJIH MLADIC

1. METODA

Ta metoda preskušanja toksičnosti za rast ustreza metodi OECD TG 215 (2000).

1.1 UVOD

Ta preskus je namenjen ocenjevanju vplivov daljše izpostavljenosti kemikalijam na rast ribjih mladic. Temelji na metodi, ki je bila razvita in krožno preskušena (1) (2) v Evropski uniji, za ocenjevanje vplivov kemikalij na rast mladic šarenke *(Oncorhynchus mykiss)* v pretočnih pogojih. Lahko se uporabljajo tudi druge dobro dokumentirane vrste. Veliko izkušenj je bilo na primer pridobljenih s preskusi rasti na cebrici *(Danio rerio)* [1] (3) (4) in medaki (medaka, *Oryzias latipes)* (6) (7) (8).

Glej tudi Splošni uvod Del C.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Najnižja koncentracija z opaznim učinkom (Lowest observed effect concentration – LOEC): je najnižja preskušena koncentracija preskusne snovi, pri kateri je bilo opaženo, da ima snov pomemben učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar pa morajo imeti vse preskusne koncentracije nad LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji kot učinek, opažen pri LOEC.

Koncentracija brez opaznih učinkov (No observed effect concentration – NOEC): je preskusna koncentracija tik pod LOEC.

$\mathbf{EC_x}$: v tej preskusni metodi je to koncentracija preskusne snovi, ki povzroča x % variacije v stopnji rasti rib, kadar jo primerjamo s kontrolo.

Stopnja obremenitve: je mokra teža rib na prostornino vode.

Gostota rib: je število rib na prostornino vode.

Specifična stopnja rasti posameznih rib: izraža stopnjo rasti posamezne ribe na osnovi njene začetne teže.

Povprečna specifična stopnja rasti v bazenu: izraža srednjo stopnjo rasti populacije bazena pri eni koncentraciji.

Psevdo-specifična stopnja rasti: izraža stopnjo rasti posamezne ribe v primerjavi s srednjo začetno težo populacije bazena.

[1] Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, str. 231–236.

▼B

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Mladice v fazi eksponentne rasti se po tehtanju dajo v preskusne komore in izpostavijo nizu subletalnih koncentracij preskusne snovi, ki je raztopljena v vodi, po možnosti s pretokom, ali, če to ni mogoče, pod ustreznimi polstatičnimi pogoji (statični pogoji s periodičnim obnavljanjem). Preskus traja 28 dni. Ribe se hranijo vsak dan. Obrok hrane temelji na začetni teži rib in se lahko ponovno preračuna po 14 dneh. Na koncu preskusa se ribe ponovno stehtajo. Učinki na stopnjo rasti se analizirajo z uporabo regresijskega modela, da se oceni koncentracija, ki povzroči x % variacijo v stopnji rasti, t.j. EC_X (npr. EC_{10}, EC_{20}, ali EC_{30}). Druga možnost pa je, da se podatki primerjajo s kontrolnimi vrednostmi, da bi določili najnižjo koncentracijo z opaznim učinkom (LOEC) ter tudi koncentracijo brez opaznih učinkov (NOEC).

1.4 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

Na voljo bi morali biti rezultati preskusa akutne toksičnosti (glej preskusno metodo C.1), ki je bil po možnosti izveden na vrsti, izbrani za ta preskus. To pomeni, da sta znana topnost preskusne snovi v vodi in parni tlak preskusne snovi ter da je na voljo zanesljiva analitska metoda za določitev količine snovi v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo in mejo detekcije.

Koristni podatki zajemajo tudi strukturno formulo, čistost snovi, stabilnost v vodi in na svetlobi, pKa, P_{ow} in rezultate preskusov za lahko biorazgradljivost (glej preskusno metodo C.4).

1.5 VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— smrtnost v kontroli (kontrolah) na koncu preskusa ne sme presegati 10 %,

— srednja teža rib v kontroli (kontrolah) se mora dovolj povečati, da omogoča odkrivanje minimalnih variacij stopenj rasti, ki veljajo za pomembne. Krožni preskus (3) je pokazal, da se mora pri šarenki srednja teža rib v kontroli povečati vsaj za polovico (t.j. 50 %) njihove srednje začetne teže v 28 dneh; npr. začetna teža: 1 g/ribo (= 100 %), končna teža po 28 dneh: > 1,5 g/ribo (> 150 %),

— koncentracija raztopljenega kisika mora ves čas preskusa znašati vsaj 60 % nasičenosti zraka (air saturation value – ASV),

— razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih komorah med preskusom nikoli ne sme biti večja od ± 1 °C in jo je treba ohranjati v razponu 2 °C znotraj temperaturnih razponov, ki so določeni za preskusno vrsto (Dodatek 1).

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Naprave**

Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

— oksimetri in pH-metri,

▼B

— oprema za ugotavljanje trdote in alkalnosti vode,

— ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje,

— bazeni, izdelani iz kemijsko inertnih materialov, in primernega volumna glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej poglavje 1.8.5 in Dodatek 1),

— primerna točna tehtnica (t.j. točna do ± 0,5 %).

1.6.2 **Voda**

Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri kaže preskusna vrsta primerno dolgotrajno preživetje in rast. V času preskusa mora biti voda konstantne kakovosti. pH-vrednost vode mora biti med 6,5 in 8,5, v enem preskusu pa mora biti v območju ± 0,5 pH enote. Priporoča se trdota vode nad 140 mg/l (kot $CaCO_3$). Da bi zagotovili, da voda za redčenje ne bo preveč vplivala na rezultate preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne snovi), je treba v ustreznih časovnih razmakih vzeti vzorce za analizo. Izvajati je treba meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl in SO_4), pesticidov (npr. skupnih organofosforjevih in skupnih organoklorovih pesticidov), skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih delcev, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje relativno konstantne kakovosti. Če je dokazano, da je kakovost vode konstantna vsaj eno leto, se lahko meritve izvajajo manj pogosto, časovni razmaki pa se lahko podaljšajo (npr. na vsakih šest mesecev). Nekatere kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2.

1.6.3 **Preskusne raztopine**

Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine.

Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne snovi v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem ali ultrazvokom). Za to, da se dobi primerno koncentrirana osnovna raztopina se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine.

V nekaterih primerih je lahko potrebna uporaba topil ali disperzijskih sredstev (topila), da se pripravi primerno koncentrirana osnovna raztopina. Med primernimi topili so aceton, etanol, metanol, dimetilsulfoksid, dimetilformamid in trietilenglikol. Med primernimi disperzij skimi sredstvi so Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01 % in HCO-40. Pri uporabi lahko biorazgradljivih sredstev (npr.aceton) in/ali lahko hlapnih spojinah je treba paziti, saj lahko povzročijo težave zaradi namnožitve bakterij pri pretočnih preskusih. Kadar se uporabi topila, to ne sme imeti pomembnega vpliva na rast rib niti vidnih škodljivih učinkov na mladice, kar se pokaže s kontrolo, v kateri je le topilo.

▼B

Pri pretočnih preskusih je potreben sistem, ki stalno odmerja in redči osnovno raztopino preskusne snovi (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik, sistem naprav za nasičenje), da v preskusne komore dovaja serije koncentracij. Pretok osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba preverjati v ustreznih časovnih razmakih, po možnosti vsak dan, med preskusom in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Krožni preskus (3) je pokazal, da je pri šarenki sprejemljiva pogostost odstranjevanja vode med preskusom 6 litrov/g ribe/dan (glej poglavje 1.8.2.2).

Za semi-statične (obnavljajoče) preskuse, bo pogostost obnavljanja medija odvisna od stabilnosti preskusne snovi, vendar se priporoča dnevno obnavljanje vode. Če iz predhodnih preskusov stabilnosti (glej poglavje 1.4) izhaja, da koncentracija preskusne snovi ni stabilna (t.j. izven območja 80–120 % nominalne ali pod 80 % izmerjene začetne koncentracije) v času obnavljanja, je treba razmisliti o izvedbi pretočnega preskusa.

1.6.4 **Izbira vrst**

Priporočena vrsta za ta preskus je šarenka *(Oncorhynchus mykiss),* ker je bila večina izkušenj pridobljenih s krožnimi preskusi s to vrsto rib (1) (2). Uporabi pa se lahko tudi druge dobro dokumentirane vrste, za katere obstajajo dobri zapisi, vendar bo pri tem morda treba preskusni postopek prilagoditi, da se zagotovijo primerni preskusni pogoji. Izkušnje so na primer na voljo tudi za cebrico *(Danio rerio)* (3) (4) in medako *(Oryzias latipes)* (5) (6) (7). V tem primeru je treba izbor vrste in eksperimentalne metode utemeljiti v poročilu.

1.6.5 **Vzdrževanje rib**

Preskusne ribe se izberejo iz populacije enega staleža, po možnosti iz istega drsta, ki so bile vsaj dva tedna pred preskusom kar zadeva kakovost vode in svetlobo v pogojih, podobnih tistim, ki se uporabijo v preskusu. Ves čas vzdrževanja rib in med preskusom je treba ribe hraniti z minimalnim obrokom 2 % telesne teže na dan in po možnosti 4 % telesne teže na dan.

Po 48-urnem času prilagoditve, se evidentira smrtnost in uporabijo se naslednja merila:

— smrtnost v sedmih dneh je večja od 10 % populacije: celotna serija se zavrne,

— smrtnost med 5 in 10 % populacije: prilagoditev naj traja dodatnih sedem dni; če je v drugih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se zavrne celotna serija,

— smrtnost v sedmih dneh manjša od 5 % populacije: serija se sprejme.

Ribe v dveh tednih pred preskusom ali med poskusom ne smejo biti zdravljene zaradi bolezni.

▼B

1.7 NAČRT PRESKUSA

Izraz „načrt preskusa“ se nanaša na izbiro števila in razmakov med preskusnimi koncentracijami, število bazenov za vsako koncentracijo ter število rib na bazen. V idealnem primeru bi bil načrt preskusa izbran ob upoštevanju:

— cilja študije,

— metode statistične analize, ki bo uporabljena,

— razpoložljivosti in stroškov eksperimantalnih virov.

Če je mogoče, bi morala izjava o cilju določati statistično moč, pri kateri se zahteva zaznava dane velikosti razlike (npr. v stopnji rasti), ali – druga možnost – določati točnost, s katero mora biti ocenjen EC_X (npr. z x = 10, 20 ali 30 in po možnosti ne manj kot 10). Brez tega ne more biti zagotovo predpisana obsežnost študije.

Pomembno je vedeti, da lahko načrt preskusa, ki je optimalen (najbolje izkoristi vire) za uporabo ene metode statistične analize, ni nujno optimalen za drugo. Priporočeni načrt za oceno LOEC/NOEC torej ne bi bil enak kot načrt, priporočen za regresijsko analizo.

V večini primerov je regresijska analiza bolj zaželena kot analiza variance iz razlogov, ki jih obravnavata Stephan in Rogers (8). Kadar pa se ne najde noben primeren regresijski model ($r^2 < 0,9$), je treba uporabiti metodo LOEC/NOEC.

1.7.1 **Načrt preskusa za regresijsko analizo**

Pri načrtu preskusa, ki naj bi ga analizirali z regresijo, je pomembno razmisliti o naslednjem:

— Koncentracija z učinkom (npr. $EC_{10,20,30}$) in razpon koncentracije, v katerem je vpliv preskusne snovi zanimiv, bi morala biti zajeta s koncentracijami, vključenimi v preskus. Natančnost, s katero se ocenijo koncentracije z učinkom, bo največja, ko je koncentracija z učinkom na sredini razpona preskušanih koncentracij. V pomoč pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij je lahko predhodni preskus za ugotavljanje območja.

— Za zagotovitev zadovoljivega statističnega modeliranja mora preskus vključevati vsaj en kontrolni bazen in pet dodatnih bazenov z različnimi koncentracijami. Kjer je to ustrezno, je treba pri uporabi topila poleg preskusne serije izvesti eno kontrolo, ki vsebuje topilo pri najvišji preskušani koncentraciji (glej poglavja 1.8.3 in 1.8.4).

— Uporabi se lahko ustrezno geometrijsko zaporedje ali logaritemsko zaporedje (9) (glej Dodatek 3). Zaželeno je logaritemsko določanje razmakov med preskusnimi koncentracijami.

▼B

— Če je na voljo več kot šest bazenov, se dodatni bazeni bodisi uporabijo za zagotovitev ponovitve preskusa bodisi razporedijo preko razpona koncentracij, da se omogočijo manjši razmaki med koncentracijami. Kateri koli od teh dveh ukrepov je enako zaželen.

1.7.2 **Načrt za oceno NOEC/LOEC z uporabo analize variance (ANOVA)**

Po možnosti bi morale biti na voljo ponovitveni bazeni za vsako koncentracijo, statistična analiza pa bi morala biti izvedena na ravni bazenov (10). Brez ponovitvenih bazenov ne moremo ugotavljati variabilnosti med bazeni, razen variabilnosti zaradi posameznih rib. Vendar pa izkušnje kažejo (11), da je bila med-bazenska variabilnost zelo majhna v primerjavi z variabilnostjo znotraj enega bazena (t.j. med ribami) v preučenem primeru. Zato je relativno sprejemljiva možnost, da se izvede statistična analiza na ravni posameznih rib.

Običajno se uporablja vsaj pet preskusnih koncentracij v geometričnem zaporedju s faktorjem, ki po možnosti ne presega 3,2.

V splošnem, kadar so preskusi izvedeni s ponovitvenimi bazeni, bi moralo biti število ponovitvenih kontrolnih bazenov in zato število rib dvakrat tolikšno kot število pri vsaki od preskusnih koncentracij, ki bi morale biti enake velikosti (12) (13) (14). V nasprotnem primeru, ko ni na voljo ponovitvenih bazenov, bi moralo biti število rib v kontrolni skupini enako številu rib pri vsaki preskusni koncentraciji.

Če naj ANOVA temelji na bazenih in ne na posameznih ribah (kar bi vključevalo ali posamično označevanje rib ali uporabo psevdo-specifičnih stopenj rasti (glej poglavje 2.1.2), je potrebno dovolj veliko število ponovitvenih bazenov, da se omogoči določitev standardnega odklona „bazenov ene koncentracije“. To pomeni, da bi morale biti stopinje prostosti napake v analizi variance vsaj 5 (10). Če so ponovljene le kontrole, obstaja nevarnost, da bo variabilnost napak pristranska, ker se lahko poveča s srednjo vrednostjo zadevne stopnje rasti. Ker je verjetno, da se bo s povečevanjem koncentracije stopnja rasti manjšala, to lahko vodi k precenjevanju variabilnosti.

1.8 POSTOPEK

1.8.1 **Izbira in tehtanje preskusnih rib**

Pomembno je, da se že na začetku preskusa čim bolj zmanjša variacija teže rib. Primerni razponi velikosti za različne vrste, priporočene za uporabo v tem preskusu, so navedeni v Dodatku 1. Za celo serijo rib, ki so uporabljene v preskusu se v idealnem primeru razpon posameznih tež na začetku preskusa vzdržuje znotraj ± 10 % aritmetične sredine teže in v nobenem primeru ne sme presegati 25 %. Priporočljivo je, da se pred preskusom stehta podvzorec rib, da bi ocenili srednjo težo.

▼B

Osnovne populacije rib se ne sme hraniti 24 ur pred začetkom preskusa. Ribe se nato izberejo naključno. Z uporabo splošnega anestetika (npr. vodna raztopina 100 mg/l trikain metan sulfonata (MS 222), nevtralizirana z dodatkom dveh delov natrijevega bikarbonata na del MS 222), se določi mokra teža posameznih rib (osušenih s pivnikom) z natančnostjo, navedeno v Dodatku 1. Ribe s težo znotraj zaželenega razpona se zadržijo in naključno porazdelijo po preskusnih posodah. Zapiše se skupna mokra teža rib v vsaki preskusni posodi. Uporaba anestetika in rokovanje z ribami (vključno s sušenjem in tehtanjem) lahko pri mladicah povzroči stres in poškodbe, zlasti pri majhnih vrstah. Zato je treba z mladicami ravnati izredno pazljivo, da se izognemo povzročanju stresa in poškodb preskusnih živali.

Ribe se ponovno stehtajo na 28. dan preskusa (glej poglavje 1.8.6). Če pa se zdi potrebno, da bi ponovno preračunali obroke hrane, se lahko ribe ponovno stehtajo na 14. dan preskusa (glej poglavje 1.8.2.3). Lahko se uporabi tudi kakšna druga metoda, kot je fotografska metoda, da se ugotovi spremembe v velikosti rib, na osnovi katerih se lahko prilagodijo obroki hrane.

1.8.2 **Pogoji izpostavljenosti**

1.8.2.1 *Trajanje*

Preskus traja ≥ 28 dni.

1.8.2.2 *Stopnje obremenitve in gostota populacij*

Pomembno je, da sta stopnja obremenitve in gostota rib ustrezni za uporabljeno preskusno vrsto (glej Dodatek 1). Če je gostota rib prevelika, bo prišlo do stresa zaradi gneče, kar bo povzročilo zmanjšano stopnjo rasti in mogoče bolezen. Če je gostota premajhna, lahko to povzroči teritorialno vedenje, ki bi tudi lahko vplivalo na rast. V vsakem primeru bi morala biti stopnja obremenitve dovolj nizka, da se lahko ohranja koncentracija raztopljenega kisika vsaj 60 % nasičenosti zraka brez prezračevanja. Krožni preskus (3) je pokazal, da je sprejemljiva stopnja obremenitve za šarenko 16 rib, težkih 3-5 g, na 40 litrov. Priporočena pogostost odstranjevanja vode med preskusom je 6 litrov/g ribe/dan.

1.8.2.3 *Hranjenje*

Ribe je treba hraniti z ustrezno hrano (Dodatek 1) z zadostno stopnjo, da se omogoči sprejemljiva stopnja rasti. Paziti je treba, da ne pride do rasti mikrobov in kalnosti vode. Pri šarenki je verjetno, da bo stopnja 4 % njihove teže na dan tem pogojem zadostila (2) (15) (16) (17). Dnevni obrok se lahko razdeli na dva enaka dela, ki se dasta ribam v dveh obrokih na dan v razmaku vsaj petih ur. Obrok temelji na začetni skupni teži vseh rib za vsako preskusno posodo. Če se ribe ponovno stehtajo na 14. dan, se obrok ponovno preračuna. Pred tehtanjem se rib 24 ur ne sme hraniti.

▼B

Hrano, ki je ribe ne pojedo, in fekalije je treba odstraniti iz posod vsak dan tako, da se s sesalko previdno očisti dno vsakega bazena.

1.8.2.4 *Svetloba in temperatura*

Fotoperioda in temperatura vode bi morali biti ustrezni za preskusno vrsto (Dodatek 1).

1.8.3 **Preskusne koncentracije**

Običajno je potrebnih pet koncentracij preskusne snovi, ne glede na načrt preskusa (glej poglavje 1.7.2). V pomoč pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij je predhodno znanje o toksičnosti preskusne snovi (npr. iz akutnega preskusa in/ali iz študij za ugotavljanje območja). Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Najvišja preskušana koncentracija ne sme preseči meje topnosti snovi v vodi.

Kadar se za pomoč pri pripravi osnovne raztopine uporabi topilo, njegova končna koncentracija ne sme biti večja od 0,1 ml/l in je po možnosti enaka v vseh preskusnih posodah (glej poglavje 1.6.3). Vendar pa si je treba prizadevati, da se uporabi takih materialov izognemo.

1.8.4 **Kontrole**

Število kontrol z vodo za redčenje je odvisno od načrta preskusa (glej poglavja 1.7–1.7.2). Če se uporabi topilo, je treba vključiti tudi enako število kontrol s topilom kot kontrol z vodo za redčenje.

1.8.5 **Pogostost analitskih določitev in meritev**

Med preskusom se v rednih časovnih razmakih ugotavljajo koncentracije preskusne snovi (glej spodaj).

V pretočnih preskusih je treba pretok raztopin za redčenje in osnovne raztopine preskusne snovi preverjati v časovnih razmakih, po možnosti dnevno, in ta se med preskusom ne sme spreminjati za več kot 10 %. Kadar se pričakuje, da bo koncentracija preskusne snovi znotraj ± 20 % nominalne vrednosti (t.j. v razponu 80–120 %; glej poglavji 1.6.2 in 1.6.3), se priporoča, da se analizirajo vsaj najvišje in najnižje preskusne koncentracije na začetku preskusa in nato v tedenskih presledkih. Pri preskusih, kjer se pričakuje, da koncentracija preskusne snovi ne bo ostala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije (na osnovi podatkov o stabilnosti preskusne snovi), je treba na enak način analizirati vse preskusne koncentracije.

Pri semi-statičnih (obnavljajočih) preskusih, kjer se pričakuje, da bo koncentracija preskusne snovi ostala znotraj ± 20 % nominalne vrednosti, se priporoča, da se analizirajo vsaj najvišje in najnižje sveže pripravljene preskusne koncentracije, tik pred obnovitvijo na začetku študije in kasneje vsak teden. Pri preskusih, kjer se pričakuje, da koncentracija preskusne snovi ne bo ostala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije, je treba analizirati vse preskusne koncentracije na enak način kot pri stabilnejših snoveh.

▼B

Priporoča se, da rezultati temeljijo na merjenih koncentracijah. Če pa so na voljo dokazi, ki kažejo na to, da se je koncentracija preskusne snovi v raztopini zadovoljivo ohranjala znotraj ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali merjenih vrednostih.

Vzorce bo morda treba filtrirati (npr. z uporabo filtra z velikostjo por 0,45 μm) ali centrifugirati. Priporočen postopek je centrifugiranje. Če pa se preskusni material ne adsorbira na filtre, je lahko sprejemljivo tudi filtriranje.

Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, pH-vrednost in temperaturo v vseh preskusnih posodah. Skupna trdota, alkalnost in slanost (če je primerno) se merijo v kontrolah in eni posodi z najvišjo koncentracijo. Raztopljeni kisik in slanost (če je primerno) je treba izmeriti vsaj trikrat (na začetku, sredini in koncu preskusa). Pri semi-statičnih preskusih je priporočljivo, da se raztopljeni kisik meri pogosteje, po možnosti pred in po vsakokratni obnovitvi vode ali vsaj enkrat tedensko. pH-vrednost je treba meriti na začetku in na koncu vsakokratne obnove vode pri statičnih obnovitvenih preskusih in vsaj tedensko pri pretočnih preskusih. Trdota in alkalnost se merita enkrat na vsak preskus. Temperatura se po možnosti stalno spremlja v vsaj eni preskusni posodi.

1.8.6 **Opazovanja**

Teža: na koncu preskusa je treba stehtati vse preživele ribe kot mokro težo (ribe posušene s pivnikom) bodisi v skupinah po preskusnih posodah bodisi posamično. Tehtanje živali po preskusnih posodah je bolj zaželeno kot posamezno tehtanje, pri katerem je treba posamezne ribe označiti. V primeru merjenja posameznih tež rib za ugotavljanje specifične stopnje rasti posameznih rib, je treba tehniko označevanja izbrati tako, da se ne povzroči stres pri živalih (ustrezne so lahko alternativne možnosti drugačne od zamrzovalnega označevanja („freeze marking“), npr. uporaba tanke obarvane ribiške vrvice).

Ribe je treba pregledovati vsak dan v času trajanja preskusa, vse zunanje nepravilnosti (kot so krvavitve, razbarvanje) ter neobičajno vedenje je treba zapisati. Zapisati je treba vse smrtne primere, mrtve ribe pa čim prej odstraniti. Mrtve ribe se ne nadomeščajo, stopnja obremenitve in gostota rib pa sta zadovoljivi, da se preprečijo vplivi na rast zaradi sprememb v številu rib na bazen. Vendar pa bo treba prilagoditi stopnjo hranjenja.

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Priporoča se, da naj bo tako v načrt kot analizo preskusa vključen tudi statistik, ker so pri tej preskusni metodi mogoče precejšnje variacije načrta eksperimenta, kot na primer v številu preskusnih komor, številu preskusnih koncentracij, številu rib itd. Glede na možnosti, ki so na voljo pri načrtu preskusa, tu niso podana specifična vodila za statistični postopek.

▼B

Stopnja rasti se ne izračuna za preskusne posode, v katerih smrtnost presega 10 %. Stopnja smrtnosti pa se navede za vse preskusne koncentracije.

Ne glede na to, katera metoda se uporabi za analizo podatkov, je osrednji koncept specifična stopnja rasti r med časom t_1 in časom t_2. To se lahko opredeli na različne načine, odvisno od tega, ali so ribe posamično označene ali ne, oziroma ali je potrebno povprečje bazena.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

pri čemer je:

r_1 = specifična stopnja rasti posamezne ribe

r_2 = povprečna specifična stopnja rasti v bazenu

r_3 = „psevdo“-specifična stopnja rasti

W_1, W_2 = teži posamezne ribe ob času t_1 in času t_2

$\log_e w_1$ = logaritem teže posamezne ribe ob začetku študije

$\log_e w_2$ = logaritem teže posamezne ribe ob koncu študije

$\log_e W_1$ = povprečje logaritmov vrednosti w_1 za ribe v bazenu ob začetku študije

$\log_e W_2$ = povprečje logaritmov vrednosti w_2 za ribe v bazenu ob koncu študije

t_1, t_2 = čas (dnevi) na začetku in na koncu študije

r_1, r_2, r_3 se lahko izračunajo za obdobje od 0–28 dni in, kjer je to ustrezno (npr. ko je bila izvedena meritev na 14. dan), za obdobje od 0–14 dni in 14–28 dni.

2.1.1 **Regresijska analiza rezultatov (model koncentracija-odziv)**

Ta metoda poišče primerno matematično razmerje med specifično stopnjo rasti in koncentracijo in tako omogoča oceno „EC_X“, t.j. katero koli potrebno vrednost EC. Z uporabo te metode izračun vrednosti r za posamezne ribe (r_1) ni nujen in namesto tega lahko analiza temelji na povprečni vrednosti r za bazen (r_2). Zaželena je slednja metoda. Prav tako pa je ta ustreznejša v primeru uporabe najmanjših vrst.

Povprečne specifične stopnje rasti v bazenih (r_2) je treba grafično prikazati v odvisnosti od koncentracije, da se preveri razmerje med koncentracijo in odzivom.

▼B

Za izražanje razmerja med r_2 in koncentracijo je treba izbrati ustrezen model in izbira modela mora biti ustrezno utemeljena.

Če je število preživelih rib v vsakem bazenu različno, je treba pretehtati proces prilagoditve modela („model fitting“), pa naj bo ta enostaven ali nelinearen, da se upoštevajo neenake velikosti skupin.

Metoda prilagoditve modela („fitting of model“) mora omogočati oceno, na primer, EC_{20} in njene porazdelitve (bodisi standardna napaka ali interval zaupanja). Graf prilagojenega modela je treba prikazati v odvisnosti od podatkov, da se lahko razbere ustreznost prilagoditve modela („fit of the model“) (8) (18) (19) (20).

2.1.2 **Analiza rezultatov za oceno LOEC**

Če je preskus vključeval ponovitvene bazene pri vseh koncentracijah, lahko ocena LOEC temelji na analizi variance (ANOVA) povprečne specifične stopnje rasti v posameznih bazenih (glej poglavje 2.1), ki ji sledi ustrezna metoda (npr. Dunnettov ali Williamsov test (12) (13) (14) (21)) primerjave povprečja r za vsako koncentracijo s povprečjem r za kontrole, z namenom, da se identificira najnižja koncentracija, za katero je ta razlika pomembna pri stopnji verjetnosti 0,05. Če niso izpolnjene zahtevane domneve za parametrske metode – nenormalna porazdelitev (npr. Shapiro-Wilov test) ali heterogena varianca (Bartlettov test), je potreben razmislek o preoblikovanju podatkov, da se poenotijo variance pred izvedbo ANOVA, ali pred izvedbo tehtane ANOVA.

Če preskus ni vključeval ponovitvenih bazenov za vsako koncentracijo, bo ANOVA, ki temelji na bazenih, neobčutljiva ali nemogoča. V takem primeru je sprejemljiv kompromis, da ANOVA temelji na „psevdo“-specifični stopnji rasti r_3 za posamezne ribe.

Povprečje r_3 za vsako preskusno koncentracijo se potem lahko primerja s povprečnim r_3 za kontrole. LOEC se lahko določi kot prej. Zavedati se je treba, da ta metoda niti ne upošteva niti ne zagotavlja zaščite pred variabilnostjo med bazeni, razen tiste, ki je utemeljena z variabilnostjo med posameznimi ribami. Izkušnje pa so pokazale (8), da je bila variabilnost med bazeni zelo majhna v primerjavi z variabilnostjo znotraj bazena (t.j. med ribami). Če posamezne ribe niso vključene v analizo, mora biti zagotovljena metoda določitve osamelcev in treba je utemeljiti njeno uporabo.

2.2 RAZLAGA REZULTATOV

Rezultati morajo biti previdno obrazloženi, kadar so merjene koncentracije snovi v preskusnih raztopinah blizu meje detekcije analitske metode ali, pri semi-statičnih preskusih, kadar se koncentracija preskusne snovi zmanjša med sveže pripravljeno raztopino in pred obnovo.

2.3 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje podatke:

▼B

2.3.1 **Preskusna snov:**

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijski podatki o kemikaliji, vključno s čistostjo in analitsko metodo za količinsko določanje preskusne snovi, kjer je to ustrezno.

2.3.2 **Preskusna vrsta:**

— znanstveno ime, če je mogoče,

— ev, velikost, dobavitelj, kakršno koli predhodno tretiranje itd.

2.3.3 **Preskusni pogoji:**

— uporabljeni preskusni postopek (npr. semi-statični/obnavljajoči, pretočni, obremenitev, gostota rib itd.),

— načrt preskusa (npr. število preskusnih posod, preskusnih koncentracij in ponovitev, število rib na posodo),

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navedena morata biti topilo in njegova koncentracija, kadar se uporabi),

— nominalna preskusna koncentracija, srednje vrednosti izmerjenih vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah in metoda, s katero so bile te dobljene, ter dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne snovi v pravi raztopini,

— značilnosti vode za redčenje: pH-vrednost, trdota, alkalnost, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, koncentracija sledi klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik, suspendirani trdni delci, slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in katere koli druge izvedene meritve,

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH-vrednost, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika,

— podrobni podatki o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

2.3.4 **Rezultati:**

— dokazi, da so kontrole izpolnjevale merilo preživetja za veljavnost, in podatki o smrtnosti v kateri koli od preskusnih koncentracij,

— uporabljene statistične analitske tehnike, statistika, ki temelji na ponovitvah ali ribah, obdelava podatkov in upravičenost uporabljenih tehnik,

— tabelaričen prikaz podatkov o posameznih in srednjih težah rib v dnevih 0, 14 (če so bile merjene) in 28, vrednosti povprečne stopnje rasti v bazenu ali psevdo-specifične stopnje rasti (kakor je ustrezno) za obdobje od 0–28 dni ali po možnosti od 0–14 dni in od 14–28 dni,

— rezultati statistične analize (t.j. regresijske analize ali ANOVA), po možnosti v tabelarični in grafični obliki in LOEC ($p = 0,05$) in NOEC ali EC_X, če je mogoče s standardnimi napakami,

▼B

— pojav kakršnih koli neobičajnih reakcij rib in kakršnih koli vidnih učinkov, ki jih povzroči preskusna snov.

3. LITERATURA

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, str. 1855–1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Hofte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, str. 157–164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes).*Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, str. 287–297.

(7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka *{Oryzias latipes)*. Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

(8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, str. 328–338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, str. 81.

(10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, str. 1096–1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, str. 482–491.

▼B

(14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, str. 103–117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, str. 123–133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, str. 33–41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and Mclntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study, report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

(20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05–88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. Str. 12.

(21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, str. 510–531.

▼B

DODATEK 1

PRIPOROČENE VRSTE RIB ZA PRESKUŠANJE IN USTREZNI POGOJI PRESKUŠANJA

Vrsta	Priporočen razpon preskusne temperature (° C)	Fotoperioda (v urah)	Priporočen razpon začetne teže rib (g)	Zahtevana natančnost merjenja	Stopnja obremenitve (g/l)	Gostota rib (na liter)	Hrana	Dolžina preskusa (v dnevih)
Priporočena vrsta:								
Oncorhynchus mykiss šarenka	12,5–16,0	12–16	1–5	Zaokrožanje na najbližjih 100 mg	1,2–2,0	4	Suha hrana zaščitene znamke za salmonidne mladice	≥ 28
Druge dobro dokumentirane vrste:								
Danio rerio cebrica	21–25	12–16	0,050–0,100	Zaokrožanje na najbližji 1 mg	0,2– - 1,0	5–10	Živa hrana (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes medaka	21–25	12–16	0,050–0,100	Zaokrožanje na najbližji 1 mg	0,2–1,0	5– 20	Živa hrana (*Brachionus Artemid*)	≥ 28

▼B

DODATEK 2

NEKATERE KEMIJSKE ZNAČILNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

SNOV	KONCENTRACIJA
Trdni delci	< 20 mg/l
Skupni organski ogljik	< 2 mg/l
Neionizirani amoniak	< 1 µg/l
Ostanek klora	< 10 µg/l
Skupni organofosfomi pesticide	< 50 ng/l
Skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/1
Skupni organski klor	< 25 ng/1

▼B

DODATEK 3

Logaritmične serije koncentracij, primerne za preskus toksičnosti (9)

Stolpec (število koncentracij med 100 in 10, ali med 10 in 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Iz stolpca se lahko izbere serija petih (ali več) zaporednih koncentracij. Vmesne vrednosti med koncentracijami v stolpcu (x) so v stolpcu (2x + 1). Navedene vrednosti lahko predstavljajo koncentracije, izražene v odstotkih na prostornino ali težo (mg/l ali µg/l). Vrednosti se lahko množijo ali delijo s katero koli potenco števila 10, kot je ustrezno. Stolpec 1 se lahko uporabi, če je ugotovljena znatna negotovost stopnje toksičnosti.

▼B

C.15 **RIBE, PRESKUS KRATKOTRAJNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIIH IN MLADICAH S HRANILNIM MEŠIČKOM**

1. **METODA**

Ta metoda preskušanja kratkotrajne toksičnosti ustreza metodi OECD TG 212 (1998).

1.1 UVOD

Ta preskus kratkotrajne toksičnosti na ribjih embriih in mladicah s hranilnim mešičkom je kratkotrajni preskus, pri katerem se izpostavijo življenjski stadiji od novo oplojene ikre do konca stadija mladice z rumenjakovo vrečko. Pri preskusu na embriih in mladicah z rumenjakovo vrečko ni predvideno hranjenje, zato se mora preskus končati, ko se mladica še hrani iz hranilnega mešička.

Preskus je namenjen za določanje smrtnih in, delno, subletalnih učinkov kemikalij na posamezni preskušani stadij in vrsto. S tem preskusom se lahko pridobi koristne informacije, ker lahko (a) vzpostavi most med letalnimi in subletalnimi preskusi, (b) se uporabi kot presejalni preskus bodisi za popolni preskus zgodnjega razvojnega stadija ali za preskuse kronične toksičnosti in (c) se uporabi za preskušanje vrst, kjer tehnike gojitve rib niso dovolj razvite, da bi pokrile obdobje prehoda od endogenega do eksogenega hranjenja.

Ne smemo pozabiti, da na splošno lahko dajo točno oceno kronične toksičnosti kemikalij za ribe le preskusi, ki vključujejo vse razvojne stadije rib, in da lahko vsaka omejitev izpostavljenosti, glede življenskih stadijev, zmanjša občutljivost in tako podceni kronično toksičnost. Zato se lahko pričakuje, da bo preskus na embriiih in mladicah s hranilnim mešičkom manj občutljiv kot popolni preskus na zgodnjem razvojnem stadiju, zlasti kar zadeva kemikalije z visoko lipofilnostjo (log P_{ow} > 4) in kemikalije s posebnim načinom toksičnega delovanja. Pričakovali pa bi manjše razlike v občutljivosti med obema preskusoma za kemikalije z nespecifičnim, narkotičnim načinom delovanja (1).

Pred objavo tega preskusa, je bilo največ izkušenj s tem preskusom na embriih in mladicah s hranilnim mešičkom pri sladkovodni ribi *Danio rerio*, Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – cebrica). Zato so v Dodatku 1 podrobnejši napotki za izvedbo preskusa na tej vrsti. To ne izključuje uporabe drugih vrst, s katerimi imamo tudi že izkušnje (Tabela 1).

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Najnižja koncentracija z opaznim učinkom (lowest observed effect concentration – LOEC): je najnižja preskušena koncentracija preskusne snovi, pri kateri je bilo opaženo, da ima snov pomemben učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar pa morajo imeti vse preskusne koncentracije nad LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji kot učinek, opažen pri LOEC.

Koncentracija brez opaznih učinkov (no observed effect concentration – NOEC): je preskusna koncentracija tik pod LOEC.

▼B

1.3 PRINCIP PRESKUSA

Embrionalni stadij in stadij mladice s hranilnim mešičkom se izpostavita nizu koncentracij preskusne snovi, raztopljene v vodi. V okviru protokola je možna izbira med semi-statičnim in pretočnim postopkom. Izbira je odvisna od narave preskusne snovi. Preskus se začne tako, da se oplojene ikre položijo v preskusne komore, in se konča tik preden je hranilni mešiček katere koli ličinke v kateri koli preskusni komori povsem absorbiran ali preden začnejo osebki kontrole umirati od lakote. Smrtni in subletalni učinki se ocenjujejo in primerjajo s kontrolnimi vrednostmi, da se določi najnižja koncentracija z opaznim učinkom in iz tega koncentracija brez opaznih učinkov. Druga možnost je, da se jih analizira z uporabo regresijskega modela, da se oceni koncentracija, ki povzroči dani odstotek učinka (t.j. LC/EC_X, kjer je x določen % učinka).

1.4 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

Na voljo bi morali biti rezultati preskusa akutne toksičnosti (glej preskusno metodo C.1), ki je bil po možnosti izveden na vrsti, izbrani za ta preskus. Rezultati so lahko uporabni pri izbiri ustreznega obsega preskusnih koncentracij pri preskusu na zgodnjih razvojnih stadijih. Znana morata biti topnost v vodi (vključno s topnostjo v preskusni vodi) in parni tlak preskusne snovi. Na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za določitev količine snovi v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo in mejo detekcije.

Podatki o preskusni snovi, uporabni pri določanju preskusnih pogojev, vključujejo strukturno formulo, čistost snovi, stabilnost na svetlobi, stabilnost v preskusnih pogojih, pKa, P_{ow} in rezultate preskusov za lahko biorazgradljivost (glej preskusno metodo C.4).

1.5 VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— celotno število preživelih oplojenih iker v kontrolah in kadar je primerno, v posodah, kjer je samo topilo, mora biti večje ali enako mejnim vrednostim, določenih v Dodatkih 2 in 3, ali njim enako,

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti ves čas preskusa med 60 in 100 % nasičenostjo zraka (ASV),

— razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih komorah ali v zaporednih dneh med preskusom nikoli ne sme biti večja od ± 1,5 °C in jo je treba ohranjati znotraj temperaturnih razponov, ki so določeni za preskusno vrsto (Dodatka 2 in 3).

▼B

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Preskusne komore**

Uporabijo se lahko kakršne koli steklene ali druge kemijsko inertne posode. Posode morajo biti dovolj velike, da omogočajo skladnost s stopnjo obremenitve (glej poglavje 1.7.1.2). Priporočljivo je, da se preskusne komore naključno postavijo v območje, kjer poteka preskus. Kadar so v laboratoriju sistematični učinki, ki se jih lahko kontrolira z uporabo razdelitve v bloke, se bolj kot povsem naključni načrt priporoča uporaba načrta naključnih blokov, pri čemer se v vsakem bloku izvajajo vsa tretiranja. Če se uporablja razdelitev v bloke, je to treba upoštevati pri poznejši analizi podatkov. Preskusne komore morajo biti zaščitene pred neželenimi motnjami.

1.6.2 **Izbira vrst**

Priporočljive ribje vrste so navedene v Tabeli 1A. To ne izključuje uporabe drugih vrst (primeri so navedeni v Tabeli 1B), vendar bo morda treba temu prilagoditi preskusni postopek, da se zagotovijo primerni preskusni pogoji. V tem primeru je treba izbiro vrste in eksperimentalne metode utemeljiti v poročilu.

1.6.3 **Vzdrževanje plemenskih rib**

Podrobnosti o vzdrževanju plemenskih rib v zadovoljivih pogojih lahko najdemo v OECD TG 210 ([1]) in v literaturi (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4 **Ravnanje z embrii in ličinkami**

Embrii in ličinke se lahko izpostavijo v glavni posodi, v manjših posodah, ki imajo mrežaste stranice ali konce, da se lahko skozi posodo pretaka preskusna raztopina. Neturbulentni tok skozi te majhne posode se lahko doseže tako, da se posode obesijo na držalo, nameščeno tako, da premika posodo gor in dol, vendar tako, da so organizmi ves čas potopljeni; uporabi se lahko tudi sistem s sifonskim splakovanjem. Oplojene ikre salmonidnih rib lahko ležijo na podstavkih ali mrežah z dovolj velikimi luknjicami, da lahko ličinke, ko se izležejo, padejo skoznje. Za odstranjevanje embriev in ličink pri semi-statičnih preskusih s popolno vsakodnevno obnovo je primerna uporaba pasterjevih pipet (glej odstavek 1.6.6).

Kadar se za zadrževanje iker v glavni preskusni posodi uporabljajo posodice, rešetke ali mreže za ikre, je treba te priprave odstraniti, ko se ličinke izležejo ([1]), obdržijo se le mreže, da ribe ne pobegnejo. Če je treba ličinke prenesti, se te ne smejo izpostaviti zraku in pri spuščanju rib iz posod za ikre se ne smejo uporabljati lovilne mrežice (taka previdnost morda ni potrebna pri nekaterih manj nežnih vrstah, npr. pri krapu). Čas prenosa je različen, odvisno od vrste in tudi ni vselej potreben. Za semi-statično tehniko se lahko uporabijo čaše ali plitve posode, po potrebi opremljene z mrežastim zaslonom, ki je nekoliko dvignjen od dna posode. Če je prostornina teh posod zadostna glede na zahteve obremenitve (glej 1.7.1.2), prenos embriev ali ličink morda ni potreben.

([1]) OECD, Pariz, 1992, Preskusna navodila 210, Ribe, Preskus strupenosti v zgodnjih razvojnih stadijih.

▼B

1.6.5 **Voda**

Vsaka voda z ustreznimi kemičnimi lastnostmi sprejemljive vode za redčenje, naštetimi v Dodatku 4, v kateri preskušana vrsta kaže vsaj tolikšno preživetje v kontrolah, kot je opisano v Dodatkih 2 in 3, je primerna za preskusno vodo. V času preskusa mora voda ohranjati konstantno kakovost. pH-vrednost mora ostati v območju ± 0,5 pH enote. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na preskusni rezultat (na primer s kompleksacijo preskusne snovi) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmakih jemati vzorce za analizo. Izvajati je treba meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca, Mg, Na, K, Cl in SO_4), pesticidov (npr. skupnih organofosfornih in skupnih organoklornih pesticidov), skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih delcev, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje relativno konstantne kakovosti. Če se dokaže, da je bila kakovost vode konstantna vsaj eno leto, se lahko meritve izvajajo manj pogosto, časovni razmaki pa se lahko podaljšajo (npr. na vsakih šest mesecev).

1.6.6 **Preskusne raztopine**

Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine.

Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne snovi v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem ali ultrazvokom). Za to, da se dobi primerno koncentrirana osnovna raztopina se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine. Kolikor je mogoče, se je treba izogibati uporabi topil ali disperzij skih sredstev (topil); vendar so take zmesi lahko potrebne v nekaterih primerih, da se pripravi primerno koncentrirana osnovna raztopina. Primeri ustreznih topil so aceton, etanol, metanol, dimetil formamid in trietilen glikol. Primeri primernih disperzij skih sredstev Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloza 0,01 % in HCO-40. Pri uporabi lahko biorazgradljivih sredstev (npr. acetonu) in/ali lahko hlapnih spojin je treba paziti, saj lahko povzročijo težave zaradi namnožitve bakteriji pri pretočnih preskusih. Kadar se uporabi topil, to ne sme imeti pomembnega vpliva na preživetje niti opaznih škodljivih vplivov na zgodnje razvojne stadije, kar se pokaže pri kontroli, v kateri je le topilo. V vsakem primeru si je treba prizadevati, da se izognemo rabi takih materialov.

Za sem-statično tehniko se lahko uporabita dva različna postopka obnove; bodisi (i) se pripravijo nove preskusne raztopine v čistih posodah in se preživele ikre in ličinke nežno prenesejo v nove posode v majhni količini stare raztopine, ne da bi se izpostavile zraku, bodisi (ii) preskusni organizmi ostanejo v posodah, medtem ko se zamenja del (vsaj tri četrtine) preskusne vode. Pogostost obnove medija je odvisna od stabilnosti preskusne snovi, vendar se priporoča dnevna obnova vode. Če predhodni preskusi stabilnosti (glej poglavje 1.4) pokažejo, da koncentracija preskusne snovi med obnavljanji vode ni stabilna (t.j. izven razpona 80–120 % nominalne ali pod 80 % izmerjene začetne koncentracije), je treba razmisliti o izvedbi pretočnega preskusa. V vsakem primeru je treba poskrbeti, da se ličink ne izpostavlja stresu med postopkom obnavljanja vode.

▼B

Za pretočne preskuse je priporočljiv sistem, ki stalno odmerja in redči osnovno raztopino preskusne snovi (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik, sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba preverjati v ustreznih časovnih razmakih, po možnosti vsak dan, in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Ugotovljeno je bilo, da je primeren pretok enak prostornini vsaj petih preskusnih komor na 24 ur (2).

1.7 POSTOPEK

Koristne informacije o opravljanju preskusov strupenosti na ribjih embriih in mladicah s hranilnim mešičkom so na voljo v literaturi, nekateri primeri so vključeni v poglavju o literaturi v tem besedilu (7) (8) (9).

1.7.1 **Pogoji izpostavljenosti**

1.7.1.1 *Trajanje*

Preskus naj se po možnosti začne v 30 minutah po oploditvi iker. Embrii se potopijo v preskusno raztopino pred začetkom brazdanja blastodiska ali takoj po njem in v vsakem primeru pred stadijem gastrule. Pri ikrah, ki se jih dobi od komercialnega dobavitelja, preskusa morda ne bo mogoče začeti takoj po oploditvi. Ker lahko odlašanje z začetkom preskusa resno vpliva na občutljivost preskusa, je treba s preskusom začeti v osmih urah po oploditvi. Ker se ličinke v času izpostavitve ne hranijo, je treba preskus zaključiti, tik preden katera koli ličinka v kateri koli izmed preskusnih komor povsem absorbira hranilni mešiček ali preden se v kontroli začne umiranje zaradi lakote. Trajanje bo odvisno od uporabljene vrste. Nekatera priporočena trajanja so navedena v Dodatkih 2 in 3.

1.7.1.2 *Obremenitev*

Število oplojenih iker mora biti na začetku preskusa dovolj veliko, da izpolnjuje statistične zahteve. Ikre morajo biti naključno razporejene po tretiranjih in na koncentracijo je treba uporabiti vsaj 30 oplojenih iker, enakomerno porazdeljenih (ali vsaj kolikor je mogoče, ker je pri uporabi nekaterih vrst težko dobiti enake serije) med vsaj tri ponovitvene preskusne komore. Obremenitev (biomasa na prostornino preskusne raztopine) mora biti dovolj nizka za vzdrževanje koncentracije raztopljenega kisika na vsaj 60 % nasičenosti zraka brez prezračitve. Za pretočne preskuse je priporočena obremenitev, ki nikoli ne presega 0,5 g/l na 24 ur in ne presega 5 g/l raztopine (2).

1.7.1.3 *Svetloba in temperatura*

Fotoperioda in temperatura vode morata biti primerni za preskusne vrste (Dodatka 2 in 3). Za spremljanje temperature, je morda primerno uporabiti dodatno preskusno posodo.

▼B

1.7.2 **Preskusne koncentracije**

Običajno je potrebnih pet koncentracij preskusne snovi v razmakih, določenih s konstantnim faktorjem, ki ne presega 3,2. Pri izbiri obsega preskusnih koncentracij je treba upoštevati krivuljo odvisnosti LC_{50} od časa izpostavljenosti pri akutnem preskusu. V nekaterih okoliščinah bo morda primerno uporabiti manj kot pet koncentracij, na primer v mejnih preskusih, in manjši razmak med koncentracijami. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Koncentracij snovi, ki so višje od LC_{50} po 96 urah ali 100 mg/l, katera koli je nižja, ni treba preskušati. Snovi se ne sme preskušati nad njihovo mejo topnosti v preskusni vodi.

Kadar se pri pripravi osnovne raztopine uporabi topilo (glej poglavje 1.6.6), njegova končna koncentracija v preskusnih posodah ne sme biti večja od 0,1 ml/l in mora biti enaka v vseh preskusnih posodah.

1.7.3 **Kontrole**

Poleg preskusnega niza je treba imeti eno kontrolo z vodo za redčenje (z ustreznimi ponovitvami) ter, če je primerno, eno kontrolo s topilom (z ustreznimi ponovitvami).

1.7.4 **Pogostost analitskih določitev in meritev**

Med preskusom se v rednih intervalih ugotavljajo koncentracije preskusnih snovi.

Pri semi-statičnih preskusih, kjer se pričakuje, da bo koncentracija preskusne snovi ostala znotraj ± 20 % nominalne (t.j. v obsegu 80–120 %; glej oddelek 1.4 in 1.6.6), je priporočljivo, da se analizirata vsaj najvišja in najnižja preskusna koncentracija, ko sta sveže pripravljeni in takoj pred obnovitvijo ob vsaj treh priložnostih, ki so enakomerno razporejene skozi ves preskus (t.j. treba je analizirati vzorec iste raztopine – ko je sveže pripravljena in ob obnavljanju).

Za preskuse, kjer se ne pričakuje, da bo koncentracija preskusne snovi ostala znotraj ± 20 % nominalne (na podlagi podatkov o stabilnosti snovi), je treba analizirati vse preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene in ob obnavljanju, vendar po enakem režimu (t.j. ob vsaj treh priložnostih, ki so enakomerno razporejene skozi preskus). Določanje koncentracij preskusne snovi pred obnavljanjem je treba izvesti le pri eni ponovitveni posodi pri vsaki preskusni koncentraciji. Določitve je treba izvajati v ne več kot sedemdnevnih razmikih. Priporoča se, da rezultati temeljijo na merjenih koncentracijah. Če pa so na voljo dokazi, ki dokazujejo, da se koncentracija preskusne snovi v raztopini zadovoljivo ohranja znotraj ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali merjenih začetnih vrednostih.

Za pretočne preskuse je primeren podoben režim vzorčenja, kot je opisan za polstatične preskuse (vendar se v tem primeru ne merijo „stare“ raztopine). Če pa preskus traja več kot sedem dni, je priporočljivo povečati število vzorčenj v prvem tednu (npr. trije nizi meritev), da se zagotovi stabilnost preskusne koncentracije.

▼B

Vzorce je morda treba centrifugirati ali filtrirati (npr. z uporabo filtra s porami velikosti 0,45 μm). Ker pa ne centrifugiranje ne filtriranje ne ločita vselej tiste frakcije preskusne snovi, ki ni biorazpoložljiv, od biorazpoložljive frakcije, ni nujno, da se vzorci tako tretirajo.

Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, pH in temperaturo v vseh preskusnih posodah. V kontrolah in v eni posodi z najvišjo koncentracijo je treba meriti skupno trdoto in slanost (če je primerno). Raztopljeni kisik in slanost (če je primerno) je treba izmeriti vsaj trikrat (na začetku, na sredi in na koncu preskusa). Pri polstatičnih preskusih je priporočljivo, da se raztopljeni kisik meri pogosteje, po možnosti pred in po vsaki obnovitvi vode in po njej ali vsaj enkrat na teden. Pri semi-statičnih preskusih je treba pH izmeriti na začetku in na koncu vsake obnovitve vode, pri pretočnih preskusih pa vsaj enkrat tedensko. Trdoto je treba izmeriti enkrat na vsak preskus. Temperaturo je treba meriti vsak dan in jo je najbolje nenehno spremljati v vsaj eni preskusni posodi.

1.7.5 **Opazovanja**

1.7.5.1 *Stadiji razvoja embria*

Embrionalni stadij (t.j. stadij gastrule) je treba na začetku izpostavljenosti preskusni snovi kolikor je mogoče natančno preveriti. To se lahko naredi z uporabo reprezentativnega vzorca iker, ki so primerno konzervirane in očiščene. Opis in prikaz embrionalnega stadija lahko najdemo tudi v literaturi (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2 *Izvolitev in preživetje*

Vsaj enkrat na dan je treba opazovati izvalitev in preživetje in to zapisati. Zaželeno je, da so opazovanja pogostejša na začetku preskusa (npr. vsakih 30 minut v prvih treh urah), ker je v nekaterih primerih čas preživetja bolj pomemben kot le število smrti (npr. pri akutnih toksičnih učinkih). Mrtve embrie in ličinke je treba odstraniti, takoj ko jih opazimo, ker se lahko zelo hitro razkrojijo. Izjemna pazljivost je potrebna, pri odstranjevanju posameznih mrtvih osebkov, da ne udarimo ali fizično poškodujemo sosednjih iker/ličink, saj so te izjemno nežne in občutljive. Merila za smrt so različna glede na razvojni stadij:

— **za ikre:** zlasti v zgodnjih stadijih opazna izguba prosojnosti in sprememba barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz,

— **za embrie:** odsotnost gibanja telesa in/ali odstonost srčnega utripa in/ali motna razbarvanost pri vrstah, katerih embrii so sicer prosojni,

— **za ličinke:** negibnost in/ali odsotnost dihalnega gibanja in/ali odsotnost srčnega utripa in/ali bela motna obarvanost osrednjega živčnega sistema in/ali pomanjkanje odzivanja na mehanske dražljaje.

▼B

1.7.5.3 *Nenormalen videz*

Število ličink, ki kažejo nenormalne telesne oblike in/ali nenormalno obarvanost, in stadij absorbcije hranilnega mešička, je treba zapisovati v primernih intervalih, odvisno od trajanja preskusa in narave opisane anomalije. Opozoriti je treba, da so nenormalni embrii in ličinke lahko naraven pojav, in jih je v kontrolah pri nekaterih vrstah lahko več odstotkov. nenormalne živali se odstranijo iz posode šele, ko poginejo.

1.7.5.4 *Nenormalno vedenje*

Nenormalnosti, npr. hiperventilacija, nekoordinirano plavanje, netipično mirovanje je treba zapisovati v primernih časovnih razmakih odvisno od trajanja preskusa. Te učinke je sicer težko količinsko opredeliti, vendar lahko, kadar jih opazimo, pripomorejo k interpretaciji podatkov o smrtnosti, t.j. pridobijo podatke o načinu toksičnega delovanja snovi.

1.7.5.5 *Dolžina*

Na koncu preskusa je priporočljivo merjenje dolžine posameznih osebkov; uporabimo lahko standardno dolžino (dolžino do razcepa repne plavuti) ali celotno dolžino. Če pa pride do razpada ali erozije repne plavuti, je treba uporabiti standardno dolžino. Nasplošno mora biti pri preskusih, ki dobro potekajo, koeficient variacije dolžine med ponovitvami v kontrolah < 20 %.

1.7.5.6 *Teža*

Na koncu preskusa se lahko izmerijo posamezne teže; bolje je izmeriti suho težo (24 ur pri 60 ^{o}C) kot mokro težo (po sušitvi s pivnikom). Nasplošno bi moral biti pri preskusu, ki dobro poteka, koeficient variacije teže med ponovitvami v kontrolah ≤ 20 %.

Na podlagi teh opažanj bodo za statistično analizo na razpolago vsi oziroma nekateri spodaj navedeni podatki:

— kumulativna umrljivost,

— število zdravih ličink na koncu preskusa,

— čas začetka in konca izvalitve iker (t.j. 90 % izvaljenih ličink pri vsaki ponovitvi),

— število ličink, ki se izležejo vsak dan,

— dolžina (in teža) preživelih živali na koncu preskusa,

— število ličink, ki so deformirane ali nenormalnega videza,

— število ličink, ki kažejo nenormalno vedenje.

▼B

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Priporoča se, da naj bo tako v načrt kot analizo preskusa vključen tudi statistik, ker ta preskusna metoda omogoča precejšnje variacije načrta eksperimenta, kot na primer v številu preskusnih komor, številu preskusnih koncentracij, v začetnem številu oplojenih iker in v izmerjenih parametrih. Glede na možnosti, ki so na voljo pri načrtu preskusa, tu niso podana specifična navodila za statistični postopek.

Da bi ocenili LOEC/NOEC, bi bilo treba analizirati variance v vsakem nizu ponovitev z uporabo analize variance (ANOVA) ali kontingenčne tabele. Da bi naredili večkratno primerjavo med rezultati posameznih koncentracij in rezultaih v kontrolah, je lahko uporabna Dunnettova metoda (12) (13). Na voljo so tudi drugi uporabni primeri (14) (15). Izračunati je treba velikost učinka, ki ga zaznamo z uporabo ANOVA ali drugih postopkov (t.j. moč preskusa) in poročati o njem. Opozoriti je treba, da vsa opazovanja, našteta v poglavju 1.7.5.6, niso primerna za statistično analizo z ANOVA. Na primer, kumulativna smrtnost in število zdravih ličink na koncu preskusa se lahko analizirata s probit metodami.

Da bi ocenili LC/ECxs, je treba (a) ustrezno krivuljo, kot je logistična krivulja, prilagoditi podatkom, ki nas zanimajo, z uporabo statistične metode, kot je metoda najmanjših kvadratov ali metoda nelinearnih najmanjših kvadratov. Krivuljo je treba parametrizirati, tako da se lahko neposredno oceni LC/EC_X, ki nas zanima, in njegova standardna napaka. To bo zelo olajšalo izračun mej zaupanja okoli LC/EC_X. Če ni dobrih razlogov za uporabo drugačne ravni zaupanja, je treba navesti dvostransko 95 % zaupanje. Postopek prilagoditve naj po možnosti zagotavlja sredstva za oceno pomembnosti neprilagojenosti („lack of fit“). Uporabijo se lahko grafične metode za prilagajanje krivulj. Za vsa opazovanja, našteta v poglavju 1.7.5.6, je primerna regresijska analiza.

2.2 RAZLAGA REZULTATOV

Rezultate je treba razlagati previdno, kadar so merjene koncentracije toksičnih snovi v preskusnih raztopinah blizu meje detekcije analitske metode. Prav tako pazljivo je treba razložiti rezultate za koncentracije nad topnostjo snovi v vodi.

2.3 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vključevati naslednje podatke:

2.3.1 **Preskusna snov:**

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijski podatki o kemikaliji, vključno s čistostjo in analitsko metodo za količinsko določanje preskusne snovi, kjer je to ustrezno.

▼B

2.3.2 **Preskusna vrsta:**

— znanstveno ime, sev, število starševskih rib (t.j. koliko samic je bilo uporabljenih za zagotovitev potrebnega števila iker v preskusu), vir in metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje z njimi.

2.3.3 **Preskusni pogoji:**

— uporabljeni preskusni postopek (npr. semi-statični ali pretočni, časovno obdobje od oploditve do začetka preskusa, obremenitev itn.),

— fotoperioda,

— načrt preskusa (npr. število preskusnih komor in ponovitev, število embriev na ponovitev),

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnove (navesti je treba topilo in njegovo koncentracijo, če je to uporabljeno),

— nominalne preskusne koncentracije, izmerjene vrednosti, njihove srednje vrednosti in standardni odkloni v preskusnih posodah in metoda določitve, ter če je preskusna snov topna v vodi v koncentracijah pod preskušenimi, je treba priskrbeti dokaze, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne snovi v raztopini,

— značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, koncentracija sledi klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik, suspendirani trdni delci, slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in katere koli druge izvedene meritve,

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika.

2.3.4 **Rezultati:**

— rezultati kakršnih koli uvodnih študij stabilnosti preskusne snovi,

— dokazi, da kontrole ustrezajo standardom sprejemljivega preživetja za to preskusno vrsto (Dodatka 2 in 3),

— podatki o smrtnosti/preživetju v embrionalnem stadiju in stadiju ličink ter skupna smrtnost/preživetje,

— dnevi do izvalitve in število izvaljenih ličink,

— podatki o dolžini (in teži),

— pojav in opis morebitnih morfoloških nepravilnosti,

— pojav in opis morebitnih učinkov na vedenje,

— statistična analiza in obdelava podatkov,

— za preskuse, analizirane z metodo ANOVA, ocena najnižje koncentracije z opaznim učinkom (LOEC) pri $p = 0,05$ in koncentracije brez opaznih učinkov (NOEC) za vsak obravnavan odziv, vključno z opisom uporabljenih statističnih postopkov in obseg opaženega učinka,

▼B

— za preskuse, analizirane z regresijskimi tehnikami, LC/ECx in intervali zaupanja ter graf prilagojenega modela („graf of fitted model“), uporabljenega za izračun,

— pojasnilo morebitnih odstopanj od te preskusne metode.

3. **LITERATURA**

(1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, str 60. Junij 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. Str. 26.

(3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *{Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121–173.

(6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, str. 328–330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *{Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, str. 61–71.

(8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, str. 807–821.

(9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, 129–145.

(10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1–4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. Str. 36.

(12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, str. 1096–1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

(14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, str. 321–334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, str. 81.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126–134.

(18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231–236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19–28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes)*. EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G.M., Cooney J.D., Mclntyre DO., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *(Pimephales promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189–1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, str. 280.

(25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, str. 1–58.

Tabela 1A

Ribje vrste, priporočene za preskušanje

SLADKOVODNE
Oncorhvnchus mykiss Šarenka (9) (16)
Danio rerio Cebrica (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Krap (8) (19)
Oryzias latipes Medaka (20) (21)
Pimephales promelas Črnoglavi pisanec (8) (22)

▼B

Tabela 1B

Primeri drugih dobro dokumentiranih vrst, ki so bile tudi uporabljene

SLADKOVODNE	MORSKE
Carassius auratus Zlata ribica (8)	*Menidia peninsulae* Bibavični glavun (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Vrsta ostriža (8)	*Clupea harengus* Atlantska sled (24) (25)
	Gadus morhua Trska (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Bisernasti krapič (23) (24) (25)

▼B

DODATEK 1

SMERNICE ZA IZVEDBO PRESKUSA TOKSIČNOSTI NA EMBRIIH IN MLADICAH S HRANILNIM MEŠIČKOM CEBRICE *(Brachydanio rerio)*

UVOD

Cebrica izvira iz Koromandijske obale Indije, kjer naseljuje hitro tekoče vode. To je pogosta akvarijska riba iz družine krapov, tako da lahko podatke o njeni negi in gojenju dobimo v standardni referenčni literaturi o tropskih ribah. Njeno biologijo in uporabo v ribogojniških raziskavah, je podal Laale (1).

Ta riba redko doseže dolžino več kot 45 mm. Njeno telo je cilindrične oblike s 7–9 temno modrimi vodoravnimi srebrnkastimi progami. Proge se stekajo v repno in predrepno plavut. Hrbet je olivnozelen. Samci so vitkejši od samic. Samice so bolj srebrnkaste in njihov trebuh je napihnjen, zlasti pred drstenjem.

Odrasle ribe lahko prenesejo velika nihanja v temperaturi, pH in trdoti vode. Vendar je treba zagotoviti optimalne pogoje, da bi dobili zdrave ribe, ki proizvajajo kvalitetne ikre.

Med drstenjem samec zasleduje samico in se zaletava vanjo, in ko samica izloča ikre, jih samec oplaja. Ikre, ki so prozorne in nelepljive, padejo na dno, kjer jih starši včasih pojedo. Na drstenje vpliva svetloba. Če je jutranja svetloba primerna, se ribe navadno drstijo v zgodnjih jutranjih urah takoj po zori.

Samica lahko proizvede serije več sto iker v tedenskih razmikih.

POGOJI ZA STARŠEVSKE RIBE. REPRODUKCIJO IN ZGODNJE RAZVOJNE STADIJE

Izberite primerno število zdravih rib in jih vsaj dva tedna pred nameravanim drstenjem hranite v ustrezni vodi (npr. Dodatek 4). Skupini rib je treba omogočiti, da se razmnožujejo vsaj enkrat, preden naredijo serijo iker, ki bo uporabljena v preskusu. Gostota rib v tem času ne sme preseči 1 gram rib na liter. Redno menjavanje vode ali uporaba prečiščevalnih sistemov bosta omogočila večjo gostoto. V bazenih je treba ohranjati temperaturo 25 ± 2 °C. Ribe morajo imeti raznoliko prehrano, ki je lahko na primer sestavljena iz ustrezne komercialne suhe hrane, živih, komaj izleglih rakocov rodu Artemia, trzač, vodnih bolh, belih črvov (Enchytracheidae).

Spodaj sta opisana dva postopka, ki sta v praksi pripeljala do dovolj velike serije zdravih, oplojenih iker za izvedbo preskusa:

(i) Osem samic in 16 samcev se da v bazen s 50 litri vode za redčenje, zaščiti pred neposredno svetlobo in pusti čim bolj pri miru vsaj 48 ur. Popoldan, en dan pred začetkom preskusa se na dno akvarija položi drstitveni pladenj. Drstitveni pladenj je sestavljen iz 5–7 cm visokega okvirja (iz pleksi stekla ali drugega primernega materiala), na zgornjo stran je pritrjena 2–5 milimetrska groba mreža, na dno pa 10–30 mikrometrska fina mreža. Na grobo mrežo na okvirju pritrdimo več „drstnih debel“, ki so iz ravne najlonske vrvice. Potem ko so bile ribe 12 ur v temi, prižgemo šibko svetilko, ki bo sprožila drstenje. Dve do štiri ure po drstenju odstranimo drstitveni pladenj in poberemo ikre. Drstitveni pladenj bo ribam onemogočil, da bi pojedle ikre, hkrati pa omogočil, da se jih brez težav pobere. Skupina rib se mora drstiti vsaj enkrat pred tistim drstenjem, katerega ikre so uporabljene za preskušanje.

▼B

(ii) Pet do deset ribjih samcev in samic nastanimo posamič vsaj dva tedna pred načrtovanim drstenjem. Po 5–10 dneh se trebuhi samic napihnejo in njihove genitalne papile postanejo vidne. Samci nimajo papil. Drstenje se opravi v drstitvenih bazenih, opremljenih z lažnim prežastim dnom (kot zgoraj). Bazen je napoljnen z vodo za redčenje, tako da je gladina vode 5–10 cm nad mrežico. Dan pred načrtovanim drstenjem damo v bazen eno samico in dva samca. Postopno povečujemo temperaturo vode do ene stopinje nad prilagoditveno temperaturo. Ugasnemo svetilko in pustimo bazen čim bolj pri miru. Zjutraj prižgemo šibko svetilko, ki sproži drstenje. Po 2–4 urah odstranimo ribe in poberemo ikre. Če potrebujemo večje skupke iker, kot jih lahko dobimo od ene samice, lahko hkrati postavimo dovolj veliko število drstnih bazenov. Če si zapisujemo produktivnost posameznih samic pred preskusom (velikost in kakovost skupka), lahko izberemo tiste, ki so najbolj uspešne pri reprodukciji.

Ikre moramo prenesti v preskusne posode s steklenimi cevkami (z notranjim premerom, ki ni manjši od 4 mm), ki imajo namestljivo sesalno bučo. Količina vode pri prenosu iker mora biti čim manjša. Ikre so težje od vode in se odtočijo iz cevke. Paziti moramo, da ikre (in ličinke) ne bi prišle v stik z zrakom. Narediti je treba mikroskopski pregled vzorcev serij, da se zagotovi, da ni nepravilnosti v prvih razvojnih stadijih. Dezinfekcija iker ni dovoljena.

Stopnja smrtnosti iker je najvišja v prvih 24 urah po oploditvi. V tem obdobju je opažena smrtnost pogosto 5–40 %. Ikre degenerirajo zaradi neuspešne oploditve ali napak v razvoju. Kakovost serije iker je verjetno odvisna od samice, ker nekatere samice dosledno proizvajajo kakovostne ikre, druge pa nikoli. Serije se razlikujejo tudi v hitrosti razvoja in stopnja izvalitve. Preživetje uspešno oplojenih iker in ličink s hranilnim mešičkom je dobro, večinoma 90 %. Pri 25 °C se ličinke izležejo 3–5 dni po oploditvi in absorbirajo hranilni mešiček približno 13 dni po oploditvi.

Embrionalni razvoj sta dobro opisala Hisaoka in Battle (2). Zaradi prosojnosti iker in ličink po izvalitvi lahko sledimo razvoju ribe in opazimo prisotnost deformnosti. Približno štiri ure po drstenju lahko ločimo neoplojene ikre od oplojenih (3). Za ta pregled položimo ikre v preskusne posode majhne prostornine in jih proučujemo pod mikroskopom.

Preskusni pogoji, ki se nanašajo na zgodnje razvojne stadije, so našteti v Dodatku 2. Optimalna vrednost za pH je 7,8 in za trdoto vode pa 250 mg $CaCO_3$/l.

IZRAČUNI IN STATISTIČNI PODATKI

Priporočen je dvofazni pristop. Najprej se statistično analizirajo podatki o smrtnosti, nenormalnem razvoju in času izvalitve. Nato se statistično ovrednoti dolžina telesa pri tistih koncentracijah, pri katerih ne opazimo škodljivih učinkov na katerega koli od teh parametrov. Ta pristop je priporočljiv, ker lahko toksična snov selektivno ubija manjše ribe, odloži čas izvalitve in povzroča velike deformnosti in so zato meritve dolžine lahko pristranske. Poleg je treba pri vsakem tretiranju izmeriti približno enako število rib, da zagotovimo veljavnost preskusne statistike.

▼B

DOLOČANJE LC_{50} IN EC_{50}

Izračuna se odstotek preživelih iker in ličink ter korigira glede na smrtnost v kontrolah po Abbottovi enačbi (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

kjer je,

P = korigiran % preživelih

P' = % preživelih, opaženih v preskusni koncentraciji

C = preživetje v kontroli

Če je mogoče, se LC_{50} določa po primerni metodi na koncu preskusa.

Če želimo v statistiko EC_{50} vključiti morfološke nepravilnosti, najdemo ustrezna navodila v Stephan (5).

OCENA LOEC IN NOEC

Cilj preskusa na ikrah in mladicah s hranilnim mešičkom je primerjati koncentracije različne od nič s kontrolami, t.j. določiti LOEC. Zato moramo uporabiti postopke multiple primerjave (6) (7) (8) (9) (10).

LITERATURA

(1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121–173.

(2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, str. 311.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, str. 173–181.

(4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, str. 1–333.

(5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, str. 69–81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, str. 1096–1121.

(7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, str. 103–117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, str. 519–531.

(10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

DODATEK 2

PRESKUSNI POGOJI, TRAJANJE IN MERILA PREŽIVETJA ZA PRIPOROČENE VRSTE

VRSTA	TEMP (^{0}C)	SLANOST (0/00)	FOTO-PERIODA (ure)	TRAJANJE STADIJEV (dnevi)		TIPIČNO TRAJANJE PRESKUSA	PREŽIVETJE V KONTROLAH, (NAJMANJŠI %)	
				Embrio	mladica s hranilni m mešičko m		uspeh izvalitve	po izvalitvi
SLADKOVODNE								
Brachydanio rerio cebrica	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 5 dni po izvalitvi (8–10 dni)	80	90
Oncorhynchus mykiss šarenka	10 ± 1 ([1]) 12 ± 1 ([2])	—	0 ([a])	30–35	25–30	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 20 dni po izvalitvi (50–55 dni)	66	70
Cyprinus carpio	21 – 25	—	12–16	5	> 4	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 4 dni po izvalitvi (8–9 dni)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 ([1]) 23 ± 1 ([2])	—	12–16	8–11	4–8	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 5 dni po izvalitvi (13–16 dni)	80	80
Pimephales promelas črnoglavi pisanec	25 ± 2	—	16	4–5	5	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 4 dni po izvalitvi (8–9 dni)	60	70

([1]) Za embrie.
([2]) Za ličinke.
([a]) Tema ze embrie in ličinke, dokler ne mine en teden po izvalitvi, razen kadar se jih pregleduje. Nato blaga svetloba skozi celoten preskus

▼B

DODATEK 3

Preskusni pogoji, trajanje in merila preživetja za druge dobro dokumentirane vrste

VRSTA	TEMP (°C)	SLANOST (0/00)	FOTOPERIODA (ure)	TRAJANJE STADIJEV (dnevi)		TIPIČNO TRAJANJE PRESKUSA	PREŽIVETJE V KONTROLAH, (NAJMANJŠI %)	
				EMBRI	MLADICA S HRANILNIM MEŠIČKOM		uspeh izvalitve	po izvalitvi
SLADKOVODNE								
Carassius auratus zlata ribica	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 4 dni po izvalitvi (7 dni)	—	80
Leopomis macrochirus vrsta ostriža	21 ± 1	—	16	3	> 4	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 4 dni po izvalitvi (7 dni)	—	75
MORSKE								
Menidia peninsulae bibavični glavun	22–25	15–22	12	1,5	10	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 5 dni po izvalitvi (6–7 dni)	80	60
Clupea harengus atlantski sled	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 3 dni po izvalitvi (23–27 dni)	60	80
Gadus morhua trska	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 3 dni po izvalitvi (18 dni)	60	80
Cyprinodon variegatus biserjasti krapič	25 ± 1	15–30	12	—	—	Čim prej po oploditvi (zgodnji stadij gastrule) do 4/7 dni po izvalitvi (28 dni)	> 75	80

▼B

DODATEK 4

NEKATERE KEMIČNE ZNAČILNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Snov	Koncentracije
Trdni delci	< 20 mg/l
Skupni organski ogljik	< 2 mg/l
Neionizirani amoniak	< 1 µg/l
Klor v sledeh	< 10 µg/l
Skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
Skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
Skupna količina organskega klora	< 25 ng/l

▼B

C.16 ČEBELE DELAVKE – PRESKUS AKUTNE ORALNE TOKSIČNOSTI

1. METODA

Ta preskusna metoda akutne toksičnosti ustreza metodi OECD TG 213 (1998).

1.1 UVOD

Ta preskus toksičnosti je laboratorijska metoda, namenjena oceni akutne oralne toksičnosti fitofarmacevtskih sredstev in drugih kemikalij za odrasle čebele delavke.

Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih značilnosti snovi je lahko potrebna določitev akutne oralne toksičnosti pri čebelah, npr. kadar je verjetna izpostavljenost čebel dani kemikaliji. Preskus akutne oralne toksičnosti se izvede za določitev inherentne toksičnosti pesticidov in drugih kemikalij za čebele. Rezultate tega preskusa je treba uporabiti za določane potrebe po nadaljnjem vrednotenju. Ta metoda se lahko uporablja zlasti v programih z več koraki za ocenjevanje nevarnosti pesticidov za čebele, ki temelji na zaporednem napredovanju preskusov toksičnosti v laboratorijih do pol-poljskih in poljskih poskusih (1). Pesticidi se lahko preskušajo kot aktivne snovi (a.s.) ali kot formulirani pripravki.

Za preverjanje občutljivosti čebel in natančnosti preskusnega postopka se uporabljajo toksični standardi.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Akutna oralna toksičnost: so škodljivi učinki, ki se pojavijo v največ 96 urah (h) oralnega dajanja enkratnega odmerka preskusne snovi.

Odmerek: je količina zaužite preskusne snovi. Odmerek se izraža kot masa (ug) preskusne snovi na preskusno žival (µg/čebelo). dejanskega odmerka na vsako čebelo ni mogoče izračunati, ker se čebele hranijo skupinsko, lahko pa se oceni povprečni odmerek (v celoti zaužita preskusna snov/število preskusnih čebel v eni kletki).

LD_{50} (srednji smrtni odmerek) oralno: je statistično izpeljan enkratni odmerek snovi, ki lahko povzroči smrt pri 50 % živali, če ga dajemo po oralni poti. Vrednost LD_{50} se izraža v (ug) preskusne snovi na čebelo. Za pesticide je preskusna snov lahko bodisi aktivna snov (a.s.) ali formuliran pripravek, ki vsebuje eno ali več aktivnih snovi.

Smrtnost: žival zapišemo kot mrtvo, ko je povsem negibna.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Odrasle čebele delavke *(opis mellifera)* se izpostavijo nizu odmerkov preskusne snovi, dispregirane v raztopini saharoze. Čebele nato dobivajo enako hrano, v kateri ni preskusne snovi. Vsaj 48 ur se dnevno zapisuje smrtnost in se primerja s kontrolnimi vrednostmi. Če se stopnja smrtnosti povečuje v času med 24. in 48. uro, smrtnost kontrol pa ostaja na sprejemljivi ravni, t.j. < 10 %, je primerno, da se preskus podaljša na največ 96 ur. Rezultati se analizirajo, da se izračuna LD_{50} pri 24 in 48 urah in, če se preskus podaljša, pri 72 in 96 urah.

▼B

1.4 VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa veljajo naslednji pogoji:

— povprečna smrtnost za skupno število kontrol ne sme presegati 10 % na koncu preskusa,

— LD_{50} toksičnega standarda ustreza določenemu območju.

1.5 OPIS PRESKUSNE METODE

1.5.1 **Zbiranje čebel**

Uporabiti moramo mlade odrasle čebele delavke iste pasme, t.j. čebele iste starosti, prehranjevalnega statusa itn. Dobiti jih moramo iz kolonij z matico, ki so primerno hranjene, so zdrave, kolikor je mogoče brez bolezni, z znano zgodovino in fiziološkim stanjem. Zberemo jih lahko v zjutraj na dan preskusa ali večer pred preskusom in jih imamo pod preskusnimi pogoji do naslednjega dne.Primerne so čebele, ki jih zberemo s satnic brez zaroda. Izogibati se je treba zbiranju zgodaj spomladi in pozno jeseni, ker je v tem času fiziološko stanje čebel spremenjeno. Če je treba preskuse opraviti zgodaj spomladi ali pozno jeseni, se čebele lahko dajo v inkubator in en teden hranijo s „čebeljo pogačo“ (pelodom, nabranim iz sata) in raztopino saharoze. Čebele, ki se zdravijo s kemičnimi snovmi, kot so antibiotiki, pripravki proti varoozi itn., se ne smejo uporabljati za preskus toksičnosti štiri tedne od časa, ko se je prenehalo z zadnjim zdravljenjem.

1.5.2 **Bivalni in prehranjevalni pogoji**

Uporabljajo se kletke, ki jih je lahko čistiti in so zračne. Uporabi se lahko kateri koli primeren material, npr. nerjaveče jeklo, žična mreža, plastika ali lesene kletke za enkratno uporabo itn. Po možnosti naj bo v vsaki kletki 10 čebel. Velikost preskusnih kletk mora biti primerna za število čebel, t.j. da zagotavlja dovolj prostora.

Čebele je treba imeti v temi v prostoru, kjer se preskus izvaja pri temperaturi 25 ± 2 °C. Ves čas preskusa je treba zapisovati relativno vlažnost, ki je navadno okoli 50-70 %. Postopki ravnanja, vključno z tretiranji in opazovanji, se lahko izvajajo na (dnevni) svetlobi. Kot hrana se uporablja raztopina saharoze v vodi s končno koncentracijo 500 g/l (50 % m/V). Po danih preskusnih odmerkih, je treba zagotoviti hrano ad libitum. Sistem hranjenja mora dopuščati zapisovanje zaužite hrane za vsako kletko (glej poglavje 1.6.3.1). Uporablja se lahko steklena cevka (približno 50 mm dolga in 10 mm široka z odprtim koncem zoženim na približno 2 mm v premeru).

1.5.3 **Priprava čebel**

Zbrane čebele naključno porazdelimo v preskusne kletke, ki jih naključno postavimo v prostor, kjer se izvaja preskus.

▼B

Čebele se pred začetkom preskusa lahko stradajo do 2 uri. Priporočljivo je, da se čebel pred tretiranjem ne hrani, tako da so na začetku preskusa vse čebele v enakem stanju, glede vsebine prebavil. Umirajoče čebele moramo pred začetkom preskusa zavreči in jih nadomestiti z zdravimi.

1.5.4 **Priprava odmerkov**

Kadar je preskusna snov zmes, ki se meša z vodo, se lahko dispergira neposredno v 50-odstotni raztopini saharoze. Za tehnične proizvode in snovi, težko topne v vodi, lahko uporabimo nosilce, kot so organska topila, emulgatorji ali disperzna sredstva nizke toksičnosti za čebele (npr. aceton, dimetil formamid, dimetil sulfoksid). Koncentracija nosilca je odvisna od topnosti preskusne snovi in mora biti enaka za vse preskusne koncentracije. Vendar je splošno primerna koncentracija topila 1 %, ki se ne sme preseči.

Pripraviti je treba primerne kontrolne raztopine, t.j. kadar se za raztapljanje preskusne snovi uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba uporabiti dve ločeni kontrolni skupini: raztopino v vodi in raztopino saharoze s topilom/nosilcem v koncentraciji, uporabljeni pri preskusnih raztopinah.

1.6 POSTOPEK

1.6.1 **Preskusne in kontrolne skupine**

Število preskušenih odmerkov in ponovitev mora zadoščati statističnim potrebam za določanje LD_{50} z intervalom zaupanja 95 %. Navadno je za preskus potrebnih pet odmerkov v geometrijskem zaporedju s faktorjem, ki ne presega 2,2 in pokriva območje LD_{50}. Vendar je treba faktor redčenja in število koncentracij za odmerjanje določiti glede na nagib krivulje toksičnosti (odmerek/smrtnost) in z upoštevanjem statistične metode, izbrane za analizo rezultatov. Preskus za določitev območja omogoča izbiro primernih koncentracij za odmerjanje.

Vsako preskusno koncentracijo je treba odmeriti najmanj trem ponovitvenim preskusnim skupinam, v vsaki naj bo 10 čebel. Poleg preskusnega niza je treba pripraviti še najmanj tri kontrolne serije po 10 čebel. Vključiti je treba tudi kontrolne serije za uporabljena topila/nosilce (glej poglavje 1.5.4).

1.6.2 **Toksični standard**

V preskusni niz je treba vključiti tudi toksični standard. Za zajetje pričakovane vrednosti LD_{50}, je treba izbrati vsaj tri odmerke. Pri vsakem preskusnem odmerku je treba uporabiti najmanj tri ponovitvene kletke, v vsaki mora biti po 10 čebel. Zaželen toksični standard je dimetoat, za katerega je znana vrednost LD_{50}-24 h oralno v območju 0,10–0,35 μg a.s./čebelo (2). Kadar se lahko priskrbi dovolj podatkov za potrditev pričakovanega odziva na odmerek (npr. parati on), se lahko uporabijo drugi toksični standardi.

▼B

1.6.3 **Izpostavljenost**

1.6.3.1 *Dajanje odmerkov*

Vsaka preskusna skupina čebel mora dobiti 100–200 μl 50-odstotne vodne raztopine saharoze, ki vsebuje preskusno snov v ustrezni koncentraciji. Za proizvode z nizko topnostjo, nizko toksičnostjo ali nizko koncentracijo v formulaciji, je potrebna večja količina, ker je treba uporabiti večje deleže raztopine saharoze. Treba je spremljati količino tretirane hrane, ki jo zaužije posamezna skupina. Ko je hrana porabljena (navadno v 3–4 urah), je treba krmilnik odstraniti iz kletke in ga nadomestiti s tistim, ki vsebuje samo raztopino saharoze. Raztopina saharoze se nato dodaja *ad libitum*. Za nekatere spojine pri višjih koncentracijah je lahko posledica zavrnitve preskusnega odmerka ta, da je zaužite malo ali nič hrane. Po največ 6 urah je treba nezaužito tretirano hrano nadomestiti s čisto raztopino saharoze. Treba je oceniti količino zaužite tretirane hrane (npr. meritve prostornine/teže preostale tretirane hrane).

1.6.3.2 *Trajanje*

Najbolje je, da preskus traja 48 ur po tem, ko se preskusna raztopina zamenja s čisto raztopino saharoze. Če se smrtnost še naprej povečuje za več kot 10 % po prvih 24 urah, je treba podaljšati preskus na največ 96 ur, pod pogojem, da smrtnost kontrolnih skupin ne presega 10 %.

1.6.4 **Opazovanja**

Smrtnost se zapiše 4 ure po začetku preskusa in odtlej po 24 urah in 48 urah (t.j. po tem ko se da odmerek). Če je treba podaljšati opazovalni čas, je treba izvesti dodatna opazovanja v 24-urnih intervalih do največ 96 ur, pod pogojem da kontrolna smrtnost ne preseže 10 %.

Oceniti je treba količino zaužite hrane na skupino. Primerjava stopnje zaužitja tretirane in netretirane hrane v danih 6 urah lahko zagotovi informacije o okusnosti tretirane hrane.

Zapisati je treba vse nenormalne vedenjske učinke, opažene v preskusnem obdobju.

1.6.5 **Mejni preskus**

V nekaterih primerih (npr. kadar se pričakuje, da je preskusna snov nizke toksičnosti) se lahko naredi mejni preskus, tako da uporabimo 100 μg a.s./čebelo, da bi prikazali, da je LD_{50} večji od te vrednosti. Uporabiti je treba isti postopek, vključno s tremi ponovitvenimi preskusnimi skupinami za preskusni odmerek, ustreznimi kontrolami, oceno količine zaužite tretirane hrane in uporabo toksičnega standarda. Če se opazi umiranje, je treba izvesti popolno študijo. Če se opazijo subletalni učinki (glej poglavje 1.6.4), jih je treba zapisati.

▼B

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 PODATKI

Podatke je treba povzeti v obliki tabele, ki za vsako tretirano Skupino ter za kontrolne skupine in za skupine toksičnega standarda prikazujejo število uporabljenih čebel, smrtnost ob vsakem času opazovanja in število čebel, ki se nenormalno vedejo. Podatki o smrtnosti se analizirajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. probit analizo, drsečo sredino, binomsko verjetnostjo) (3) (4). Grafično se prikaže krivulje odziva v odvisnosti od odmerka ob vsakem priporočenem opazovalnem času in izračunajo nagib krivulj in srednji smrtni odmerki (LD_{50}) z 95 % intervalom zaupanja. Popravki glede na smrtnost kontrolnih skupin se lahko naredijo z uporabo Abbottovega popravka (4) (5). Kadar tretirana hrana ni v celoti porabljena, je treba določiti odmerek preskusne snovi, ki jo zaužije posamezna skupina. LD_{50} je treba izraziti v μg preskusne snovi na čebelo.

2.2 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje podatke:

2.2.1 **Preskusna snov:**

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti (npr. stabilnost v vodi, parni tlak),

— identifikacijski podatki o kemikaliji, vključno s strukturno formulo, čistostjo (t.j. za pesticide, identiteta in koncentracija aktivne snovi/aktivnih snovi).

2.2.2 **Preskusna vrsta:**

— znanstveno ime, pasma, približna starost (v tednih), metoda in datum zbiranja,

— informacije o kolonijah, ki so bile uporabljene za zbiranje preskusnih čebel, vključno z zdravjem, morebitno boleznijo v odraslosti, morebitnim predhodnim zdravljenjem itn.

2.2.3 **Preskusni pogoji:**

— temperatura in relativna vlažnost prostora, kjer se izvaja preskus,

— bivalni pogoji vključno z vrsto, velikostjo in materialom kletk,

— metode priprave osnovnih in preskusnih raztopin (navesti je treba topilo, če je uporabljeno, in njegovo koncentracijo),

— načrt preskusa, se pravi število in koncentracije preskusnih odmerkov, število kontrol; za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo, število ponovitvenih kletk in število čebel na kletko,

— datum preskusa.

▼B

2.2.4 **Rezultati:**

— rezultati morebitne predhodne študije za določitev območja,

— grobi podatki: smrtnost pri vsakem preskušenem odmerku v vsakem opazovalnem času,

— graf odziva v odvisnosti od odmerka na koncu preskusa,

— vrednosti LD_{50} z 95 % intervalom zaupanja ob vsakem od priporočenih opazovalnih časov za preskusno snov in toksični standard,

— statistični postopki, uporabljeni za določitev LD_{50},

— smrtnost pri kontrolah,

— drugi opaženi ali izmerjeni biološki učinki, npr. nenormalno vedenje čebel (vključno z zavračanjem preskusnih odmerkov), stopnja zaužitja hrane v tretiranih in netretiranih skupinah,

— kakršno koli odstopanje od tu opisanega preskusnega postopka in kakršni koli drugi relevantni podatki.

3. **LITERATURA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119–125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol.,18, 265–267.

▼B

C.17 ČEBELE – PRESKUS AKUTNE KONTAKTNE TOKSIČNOSTI

1. METODA

Ta metoda preskušanja akutne toksičnosti ustreza metodi OECD TG 214 (1998).

1.1 UVOD

Ta preskus toksičnosti je laboratorijska metoda, namenjena oceni akutne kontaktne toksičnosti fitofarmacevtskih sredstev in drugih kemikalij za odrasle čebele delavke.

Pri ocenjevanju in ovrednotenju toksičnih lastnosti snovi, je lahko potrebna določitev akutne kontaktne toksičnosti pri čebelah, npr. kadar je verjetna izpostavljenost čebel dani kemikaliji. Preskus akutne kontaktne toksičnosti se izvede, da se ugotovi inherentna toksičnost pesticidov in drugih kemikalij za čebele. Rezultate teh preskusov je treba uporabiti za opredelitev potrebe po nadaljnjem ocenjevanju. Ta metoda se lahko uporablja zlasti v programih z več koraki za vrednotenje nevarnosti pesticidov za čebele, ki temeljijo na zaporednem napredovanju od preskusov toksičnosti v laboratorijih do pol-poljskih in poljskih preskusov (1). Pesticidi se lahko preskušajo kot aktivne snovi (a.s.) ali kot formulirani pripravki.

Za potrditev občutljivosti čebel in natančnosti preskusnega postopka je treba uporabiti toksični standard.

1.2 OPREDELITEV POJMOV

Akutna kontaktna toksičnost: so škodljivi učinki, ki se pojavijo v največ 96 urah topične aplikacije enkratnega odmerka snovi.

Odmerek: je količina uporabljene preskusne snovi. Odmerek je izražen kot masa (μg) preskusne snovi na testno žival (μg/čebelo).

LD_{50} (srednji smrtni odmerek) pri kontaktu: je statistično dobljen enkratni odmerek snovi, ki lahko povzroči smrt pri 50 % živalih, ki se aplicira s kontaktom. Vrednost LD_{50} se navede v μg preskusne snovi na čebelo. Za pesticide je preskusna snov lahko bodisi aktivna snov (a.s.) ali formuliran proizvod, ki vsebuje eno aktivno snov ali več.

Smrtnost: žival zapišemo kot mrtvo, ko je povsem negibna.

1.3 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Odrasle čebele delavke *(Apis mellifera)* se izpostavijo nizu odmerkov preskusne snovi, raztopljene v ustreznem nosilcu, z neposredno aplikacijo na toraks (kapljice). Trajanje preskusa je 48 ur. Če se stopnja smrtnosti povečuje v času med 24. in 48. uro, medtem ko smrtnost kontrolne skupine ostaja na sprejemljivi ravni, t.j. ± 10 %, je primerno podaljšati preskus na največ 96 ur. Smrtnost se dnevno zapisuje in primerja s kontrolnimi vrednostmi. Rezultati se analizirajo, da se izračuna LD_{50} po 24-ih urah in 48 urah, in če se preskus podaljša, po 72 urah in 96 urah.

▼B

1.4 VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa veljajo naslednji pogoji:

— povprečna smrtnost za celotno število kontrol ne sme preseči 10 % na koncu preskusa,

— LD_{50} toksičnega standarda ustreza določenemu območju.

1.5 OPIS PRESKUSNE METODE

1.5.1 **Zbiranje čebel**

Uporabiti moramo mlade odrasle čebele delavke, t.j. čebele iste starosti, prehranjevalnega statusa, pasme itn. Dobiti jih moramo iz kolonij z matico, ki dobivajo primerno hrano, so zdrave, kolikor je mogoče brez bolezni, z znano zgodovino in fiziološkim stanjem. Zberemo jih lahko zjutraj na dan poskusa ali večer pred preskusom in jih imamo pod preskusnimi pogoji do naslednjega dne. Primerne so čebele, ki jih zberemo s satnic brez zaroda. Izogibati se je treba zbiranju zgodaj spomladi in pozno jeseni, ker je v tem času fiziološko stanje čebel spremenjeno. Če je treba preskuse opraviti zgodaj spomladi ali pozno jeseni, se čebele lahko dajo v inkubator in en teden hranijo s „čebeljo pogačo“ (pelodom, nabranim iz sata) in raztopino saharoze. Čebele, ki se zdravijo s kemičnimi snovmi, kot so antibiotiki, proizvodi proti varoozi itn., se ne smejo uporabiti za preskus toksičnosti štiri tedne od časa, ko se je prenehalo z zadnjim zdravljenjem.

1.5.2 **Bivalni in prehranjevalni pogoji**

Uporabljajo se kletke, ki jih je lahko čistiti in so zračne. Uporabi se lahko kateri koli primeren material, npr. nerjavno jeklo, žična mreža, plastika ali lesene kletke za enkratno uporabo itn. Velikost preskusnih kletk mora biti primerna za število čebel, t.j. da zagotavlja dovolj prostora. Po možnosti naj bo v vsaki kletki 10 čebel.

Čebele je treba imeti v temi v prostoru, kjer se izvaja preskus pri temperaturi 25 ± 2 °C. Ves čas preskusa je treba zapisovati relativno vlažnost, ki je navadno okoli 50-70 %. Postopki ravnanja, vključno z tretiranjem in opazovanji, se lahko izvajajo na (dnevni) svetlobi. Kot hrana se uporablja raztopina saharoze v vodi s končno koncentracijo 500 g/l (50 % m/v), ki jo je treba zagotavljati ad libitum v preskusnem času z uporabo krmilnika čebele. To je lahko steklena cevka (približno 50 mm dolga in 10 mm široka z odprtim koncem, zožanim na približno 2 mm v premeru).

1.5.3 **Priprava čebel**

Zbrane čebele se lahko za nanos preskusne snovi anestezirajo z ogljikovim dioksidom ali dušikom. Uporabljena količina anestetika in čas izpostavljenosti morata biti čim manjša. Umirajoče čebele moramo pred začetkom preskusa zavreči in jih nadomestiti z zdravimi.

1.5.4 **Priprava odmerkov**

Preskusno snov je treba nanesti kot raztopino v nosilcu, t.j. v organskem topilu ali v vodni raztopini z vlažilnim sredstvom. Organsko topilo naj bo po možnosti aceton, vendar se lahko uporabijo tudi druga organska topila nizke toksičnosti za čebele (npr. dimetil formamid, dimetil sulfoksid). Za formulirane pripravke dispergirane v vodi in zelo polarne organske snovi, ki niso topne v organskih topilih, je raztopine lažje nanašati, če so pripravljene v šibki raztopini komercialnega vlažilnega sredstva (npr. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Pripraviti je treba primerne kontrolne raztopine, t.j. kadar se za raztapljanje preskusne snovi uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba uporabiti dve ločeni kontrolni skupini: eno, tretirano z vodo, in eno, tretirano z topilom/disperzij skim sredstvom.

1.6 POSTOPEK

1.6.1 **Preskusne in kontrolne skupine**

Število preskušanih odmerkov in ponovitev mora zadoščati statističnim zahtevam za določitev LD_{50} z 95 % intervalom zaupanja. Navadno je za preskus potrebnih pet odmerkov v geometrijskemem zaporedju s faktorjem, ki ne presega 2,2 in pokriva območje LD_{50}. Vendar je treba število odmerkov določiti glede na nagib krivulje toksičnosti (odmerek/smrtnost) in z upoštevanjem statistične metode, ki smo jo zbrali za analizo rezultatov. Preskus za določitev območja omogoča izbiro primernih odmerkov.

Z v preskusno koncentracijo je treba izvesti vsaj tri ponovitve, v vsaki mora biti 10 čebel.

Poleg preskusnega niza je treba pripraviti še najmanj tri kontrolne serije, v vsaki mora biti po 10 čebel. Če se uporabi organsko topilo ali vlažilno sredstvo, je treba vključiti tri dodatne kontrolne skupine po 10 čebel za topilo ali vlažilno sredstvo.

1.6.2 **Toksični standard**

V preskusni niz je treba vključiti toksični standard. Da se zajame pričakovana vrednost LD_{50}, je treba izbrati vsaj tri odmerke. Pri vsakem preskusnem odmerku je treba uporabiti najmanj tri ponovitvene kletke, v vsaki mora biti po 10 čebel. Priporočljiv toksičen standard je dimetoat, za katerega je znana vrednost (kontaktna) LD_{50}-24 h v območju 0,10–0,30 µg a.s./čebelo (2). Kadar se lahko priskrbi dovolj podatkov za potrditev pričakovanega odziva na odmerek, se lahko uporabijo drugi toksični standardi (npr. paration).

1.6.3 **Izpostavljenost**

1.6.3.1 *Dajanje odmerkov*

Čebele se pod anestezijo individualno tretirajo s topično aplikacijo. Čebele se naključno dodelijo skupinam z različnim preskusnim odmerkom in kontrolam. Na hrbtno stran toraksa vsake čebele se z mikroaplikatorjem nanese 1 µl raztopine, ki vsebuje preskusno snov v primerni koncentraciji. Uporabijo se lahko tudi drugačne količine, če je to utemeljeno. Po nanosu odmerka, se čebele dajo v preskusne kletke in oskrbijo z raztopino saharoze.

1.6.3.2 *Trajanje*

Preskus naj po možnosti traja 48 ur. Če se smrtnost poveča za več kot 10 % med 24. in 48. uro, je treba podaljšati preskus na največ 96 ur, pod pogojem da smrtnost kontrolnih skupin ne presega 10 %.

▼B

1.6.4 **Opazovanja**

Smrtnost se zapiše 4 ure po odmerjanju in nato po 24 urah in 48 urah. Če je potreben podaljšan opazovalni čas, je treba izvesti dodatna opazovanja v 24 urnih časovnih razmikih, največ 96 ur, pod pogojem da smrtnost kontrolnih skupin ne presega 10 %.

Zapisati je treba vse nenormalne vedenjske učinke, opažene v času preskusa.

1.6.5 **Mejni preskus**

V nekaterih primerih (npr. kadar se pričakuje, da je preskusna snov nizke toksičnosti) se lahko naredi mejni preskus, tako da se uporabi 100 μg a.s./čebelo, da se prikaže, da je LD_{50} večji od te vrednosti. Uporabiti je treba isti postopek, vključno s tremi ponovitvenimi preskusnimi skupinami za preskusni odmerek, ustreznimi kontrolnimi skupinami in uporabo toksičnega standarda. Če se opazi umiranje, je treba izvesti popolno študijo. Če se opazijo subletalni učinki (glej poglavje 1.6.4), jih je treba zapisati.

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 PODATKI

Podatke je treba povzeti v obliki tabele, ki za vsako tretirano Skupino in za kontrolne skupine in za skupine toksičnega standarda prikazujejo število uporabljenih čebel, smrtnost ob vsakem času opazovanja in število čebel, ki se nenormalno vedejo. Podatki o smrtnosti se analizirajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. probit analizo, drsečo sredino, binomsko verjetnostjo) (3) (4). Grafično se prikaže krivulja odziva v odvisnosti od odmerka ob vsakem priporočenem opazovalnem času (t.j. 24 ur, 48 ur in, če pride v poštev, 72 ur in 96 ur) in izračunajo nagib krivulj in srednji smrtni odmerki (LD_{50}) z 95 % intervalom zaupanja. Popravki glede na smrtnost kontrolnih skupin se lahko izvedejo z uporabo Abbottovega popravka (4) (5). LD_{50} je treba izraziti v μg preskusne snovi na čebelo.

2.2 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje podatke:

2.2.1 **Preskusna snov:**

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (npr. obstojnost v vodi, parni tlak),

— identifikacijski podatki o kemikaliji, vključno s strukturno formulo, čistostjo (t.j. za pesticide, identiteta in koncentracija aktivne snovi/aktivnih snovi).

2.2.2 **Preskusna vrsta:**

— znanstveno ime, pasma, približna starost (v tednih), metoda in datum zbiranja,

— informacije o kolonijah, ki so bile uporabljene za zbiranje preskusnih čebel, vključno z zdravjem, morebitno boleznijo v odraslosti, morebitnim predhodnim zdravljenjem itn.

▼B

2.2.3 **Preskusni pogoji:**

— temperatura in relativna vlažnost eksperimentalnega prostora,

— bivalni pogoji vključno z vrsto, velikostjo in materialom kletk,

— metode nanosa preskusne snovi, npr. uporabljeno topilo, prostornina nanešene preskusne raztopine, uporabljeni anestetiki,

— načrt preskusa, npr. število in koncentracije preskusnih odmerkov, število kontrol; za vsak preskusni odmerek in kontrolo, število ponovitvenih kletk in število čebel na kletko,

— datum preskusa.

2.2.4 **Rezultati:**

— rezultati morebitne predhodne študije za določitev območja,

— grobi podatki: smrtnost pri vsaki preskušani koncentraciji ob vsakem opazovalnem času,

— graf odziva v odvisnosti od odmerka na koncu preskusa,

— vrednosti LD_{50} z 95 % intervalom zaupanja ob vsakem od priporočenih opazovalnih časov za preskusno snov in toksični standard,

— statistični postopki, uporabljeni za določitev LD_{50},

— smrtnost pri kontrolah,

— drugi opaženi ali izmerjeni biološki učinki, npr. nenormalni odzivi čebel,

— kakršno koli odstopanje od preskusnega postopka, ki je tu opisan, in kakršen koli drug relevanten podatek.

3. **LITERATURA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March, 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22, 119–125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265–267.

▼B

C.18 ADSORPCIJA/DESORPCIJA Z UPORABO METODE ŠARŽNIH PRESKUSOV RAVNOTEŽJA

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD tg 106 za določanje adsorpcije/desorpcije s pomočjo metode šaržnega ravnotežja (2000).

1.1 UVOD

Metoda upošteva krožni preskus in delavnico o izbiranju tal za razvoj preskusa adsorpcije (1) (2) (3) (4) ter tudi obstoječe smernice na nacionalni ravni (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Študije adsorpcije/desorpcije so koristne za pridobivanje bistvenih informacij o mobilnosti kemikalij in njihovi porazdelitvi v tleh, vodi in zraku znotraj biosfere (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Informacije se lahko uporabijo za napovedovanje ali ocenjevanje, na primer, razpoložljivosti kemikalije za razgradnjo (22) (23), transformacijo ali vnos v organizme (24); izluževanja skozi talni profil (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); izhlapevanja iz tal (21) (29) (30); odtekanja s površin v naravne vode (18) (31) (32). Podatki o adsorpciji se lahko uporabijo za namene primerjave in modeliranja (19) (33) (34) (35).

Porazdelitev kemikalije med talno in vodno fazo je kompleksen proces, odvisen od številnih različnih dejavnikov: kemične narave snovi (12) (36) (37) (38) (39) (40), lastnosti tal (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) in podnebnih dejavnikov, kot so padavine, temperatura, sončna svetloba in veter. Zato številnih pojavov in mehanizmov, vpletenih v proces adsorpcije kemikalije v tleh, ni mogoče popolnoma opredeliti s poenostavljenim laboratorijskim modelom, kot je ta metoda. Vendar, čeprav ne more zajeti vseh primerov, možnih v okolju, daje dragocene informacije o pomembnosti adsorpcije kemikalije za okolje.

Glej tudi Splošni uvod.

1.2 PODROČJE UPORABE

Metoda je namenjena ocenjevanju adsorpcijskega/desorpcijskega obnašanja snovi v tleh. Cilj je ugotoviti sorptivno vrednost, ki se lahko uporabi za napovedovanje porazdelitve v vrsti različnih okoljskih pogojev; s tem namenom se določijo ravnotežni adsorpcijski koeficienti za kemikalijo v različnih tleh kot funkcija lastnosti tal (npr. vsebnost organskega ogljika, vsebnost gline in tekstura tal ter pH). Uporabiti je treba različne tipe tal, da bi čim širše zajeli interakcije dane snovi s tlemi, ki jih najdemo v naravi.

Pri tej metodi adsorpcija predstavlja proces vezave kemikalije na površino tal; ne razlikuje med različnimi adsorpcijskimi procesi (fizikalna in kemijska adsorpcija) in procesi, kot so katalizirana razgradnja na površini, masovna adsorpcija ali kemična reakcija. Adsorpcija na koloidnih delcih (premer $< 0{,}2$ μm), ki jih tvorijo tla, se ne upošteva.

▼B

Parametri tal, ki veljajo za najpomembnejše pri adsorpciji so: vsebnost organskega ogljika (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); vsebnost gline in tekstura tal (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) ter pH za spojine, ki lahko ionizirajo (3) (4) (42). Drugi parametri tal, ki lahko vplivajo na adsorpcijo/desorpcijo neke snovi so efektivna kationska izmenjalna kapaciteta (ECEC), vsebnost amorfnega železa in aluminijevih oksidov, zlasti pri vulkanskih in tropskih tleh (4), ter specifična površina (49).

Preskus je namenjen ovrednotenju adsorpcije kemikalije na različne tipe tal z različno vsebnostjo organskega ogljika, vsebnostjo gline in teksturo ter pH-vrednostjo. Zajema tri stopnje:

Stopnja 1: Predhodna študija za določitev:

— razmerja tla/raztopina,

— časa potrebnega za vzpostavitev ravnotežja adsorpcije in količine preskusne snovi, adsorbirane ob ravnotežju,

— adsorpcija preskusne snovi na površine preskusnih posod in stabilnosti preskusne snovi med preskusnim obdobjem.

Stopnja 2: Presejalni preskus: adsorpcija se proučuje na petih različnih tipih tal s pomočjo kinetike adsorpcije pri eni koncentraciji in določanja porazdelitvenega koeficienta K_d in K_{oc}.

Stopnja 3: Določitev Freundlichovih adsorpcijskih izoterm za določitev vpliva koncentracije na obseg adsorpcije na tla.

Proučevanje desorpcije s pomočjo kinetike desorpcije/ Freundlichovih desorpcijskih izoterm (Dodatek 1).

1.3 OPREDELITEV POJMOV IN ENOTE

Simbol	Opredelitev	Enota
A_{t_i}	odstotek adsorpcije ob č času t_i	%
A_{eq}	odstotek adsorpcije ravnotežju ob adsorpcijskem	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masa preskusne snovi, času t_i adsorbirane na tla ob	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masa preskusne snovi, časovnem intervalu Δt_i adsorbirane na tla v	µg
$m_s^{ads}(eq)$	masa preskusne snovi, adsorbirane na tla ob adsorpcijskem ravnotežju	µg
m_0	masa preskusne snovi v epruveti na začetku preskusa adsorpcije	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masa preskusne snovi, izmerjena v alikvotu (v_a^A) občasu t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masa snovi v raztopini ob adsorpcijskem ravnotežju	µg
m_{soil}	količina talne faze, izražena v suhi masi tal	g

▼B

Simbol	Opredelitev	Enota
C_{st}	masna koncentracija osnovne raztopine snovi	μg cm^{-3}
C_0	začetna masna koncentracija preskusne raztopine v stiku s tlemi	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	masna koncentracija snovi v vodni fazi ob času t_i, ko se izvaja analiza	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	vsebnost snovi, adsorbirane na tla ob adsorpcijskem ravnotežju	μg cm^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	masna koncentracija snovi v vodni fazi ob adsorpcijskem ravnotežju	μg cm^{-3}
V_0	začetna prostornina vodne faze v stiku s tlemi med preskusom adsorpcije	cm^3
v_a^A	prostornina alikvota, v katerem se meri preskusna snov	cm^3
K_d	porazdelitveni koeficient za adsorpcijo	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	adsorpcijski koeficient, normiran na organski ogljik	cm^3 g^{-1}
K_{om}	porazdelitveni koeficient, normiran na organsko snov	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlichov adsorpcijski koeficient	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlichov eksponent	
D_{t_i}	odstotek desorpcije ob času t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	odstotek desorpcije, ki ustreza časovnemu intervalu Δt_i	%
K_{des}	navidezni desorpscijski koeficient	cm^3 g_{-1}
K_F^{des}	Freundlichov desorpscijski koeficient	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masa preskusne snovi, desorbirane s tal ob času Δt_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	masa preskusne snovi, desorbirane s tal v časovnem intervalu Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	masa snovi, določena analitsko v vodni fazi ob desorpcijskem ravnotežju	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	skupna masa preskusne snovi, desorbirane ob desorpcijskem ravnotežju	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masa snovi, ki ostane adsorbirana na tleh po časovnem intervalu Δti	μg
m_{aq}^A	masa snovi, ki ostane od adsorpcijskega ravnotežja zaradi nepopolne nadomestitve prostornine	μg
$C_s^{des}(eq)$	vsebnost preskusne snovi, ki ostane adsorbirana na tleh ob desorpcijskem ravnotežju	μg g^{-1}

▼B

Simbol	Opredelitev	Enota
$C_{aq}^{des}(eq)$	masna koncentracija preskusne snovi v vodni fazi ob desorpcijskem ravnotežju	μg cm^{-3}
V_T	skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi med poskusom kinetike desorpcije, izvedenem s serijalno metodo	cm^3
V_R	prostornina supernatanta, odstranjenega iz epruvete po vzpostavitvi adsorpcijskega ravnotežja in nadomeščenega z enako prostornino 0,01 M raztopine $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	prostornina alikvota, odvzetega iz epruvete za namen analize (i) med preskusom kinetike desorpcije, izvedenim s serijalnoo metodo	cm^3
$V_{ra}i^D$	prostornina raztopine, odvzete iz epruvete (i) za meritev preskusne snovi med poskusom kinetike desorpcije (paralelna metoda)	cm^3
V_r^F	prostornina raztopine, odvzete iz epruvete za meritev preskusne snovi ob desorpcijskem ravnotežju	cm^3
MB	masna bilanca	%
m_E	skupna masa preskusne snovi, ekstrahirane iz tal in sten preskusne posode v dveh fazah	μg
V_{rec}	prostornina supernatanta, rekuperiranega po adsorpcijskem ravnotežju	cm^3
P_{ow}	porazdelitveni koeficient oktanol/voda	
pKa	disociacijska konstanta	
S_w	topnost v vodi	g l^{-1}

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Znane prostornine raztopin preskusne snovi, neoznačene ali radioaktivno označene, pri znanih koncentracijah v 0,01 M $CaCl_2$ se dodajo vzorcem tal znane suhe teže, pri katerih je bilo predhodno doseženo ravnotežje v 0,01 M $CaCl_2$. Zmes se ustrezno dolgo stresa. Suspenzije tal se nato ločijo s centrifugiranjem in po želji s filtracijo, nato se vodna faza analizira. Količina preskusne snovi, adsorbirane na vzorcu tal, se izračuna kot razlika med količino preskusne snovi v raztopini na začetku in količino, ki ostane na koncu poskusa (posredna metoda).

Kot druga možnost se lahko količina adsorbirane preskusne snovi določi tudi neposredno z analizo tal (neposredna metoda). Ta postopek, ki zajema postopno ekstrakcijo tal z ustreznim topilom, je priporočljiv v primerih, ko razlike v koncentraciji raztopine snovi ni mogoče točno določiti. Taki primeri so na primer: adsorpcija preskusne snovi na površino preskusnih posod, nestabilnost preskusne snovi v času trajanja preskusa, šibka adsorpcija, ki povzroči samo majhno spremembo koncentracije v raztopini, ter močna adsorpcija, ki povzroči nizke koncentracije, ki jih ni mogoče točno določiti. Če se uporabi radioaktivno označena snov, se je mogoče izogniti ekstrakciji tal z analizo talne faze s sežigom in tekočinskim scintilacijskim štetjem. Vendar je tekočinsko scintilacijsko štetje nespecifična tehnika, ki ne more razlikovati med izhodiščno snovjo in produkti transformacije; zato se uporabi samo, če je preskusna kemikalija stabilna v času trajanja študije.

▼B

1.5 INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

Kemični reagenti morajo biti analitsko čisti. priporočena je uporaba neoznačenih preskusnih snovi z znano sestavo in najbolje najmanj 95-odstotno čistostjo ali radioaktivno označenih snovi z znano sestavo in radioaktivno čistostjo. V primeru sledil kratke razpolovne dobe, je treba uporabiti korekcije za upoštevanje razpadanja.

Pred izvajanjem preskusa adsorpcije/desorpcije morajo biti na voljo naslednje informacije o preskusni snovi:

(a) topnost v void (A.6);

(b) parni tlak (A.4) in/ali Henryjeva konstanta;

(c) abiotska razgradnja: hidroliza kot funkcija pH (C.7);

(d) porazdelitveni koeficient (A.8);

(e) lahka biorazgradljivost (C.4) ali aerobna in anaerobna transformacija v tleh;

(f) pKa snovi, ki lahko ionizirajo;

(g) neposredna fotoliza v vodi (t.j. absorpcijski spekter UV-VIS v vodi, kvantni izkoristek) in fotorazgradnja na tleh.

1.6 UPORABNOST PRESKUSA

Preskus se uporablja za kemične snovi, za katere je na voljo analitska metoda z zadostno točnostjo. Pomemben parameter, ki lahko vpliva na zanesljivost rezultatov, zlasti pri posredni metodi, je stabilnost preskusne snovi v času trajanja preskusa. Zato je predpogoj preverjanje stabilnosti v predhodni študiji; če se ugotovi, da pride do transformacije snovi v času, kolikor bi trajal preskus, je priporočljivo, da se glavna študija izvede z analiziranjem tako talne kot vodne faze.

Težave lahko nastanejo pri izvajanju tega preskusa na preskusnih snoveh, ki so slabo topne v vodi ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) ter pri visoko nabitih snoveh, ker koncentracije v vodni fazi ni mogoče analitično izmeriti z zadostno točnostjo. V teh primerih so potrebni dodatni koraki. Smernice za reševanje teh težav so dane v ustreznih poglavjih te metode.

Pri preskušanju hlapnih snovi je treba paziti, da med študijo ne pride do izgub.

1.7 OPIS METODE

1.7.1 **Naprave in reagenti**

Standardna laboratorijska oprema, zlasti naslednje:

(a) Epruvete ali posode za izvedbo poskusov. Pomembno je, da:

— se te epruvete ali posode neposredno prilegajo prostoru v centrifugi za preprečevanje napak pri rokovanju in prenašanju,

— so te epruvete ali posode iz inertnega materiala, ki omogoča čim manjšo adsorpcijo preskusne snovi na njihovo površino.

▼B

(b) Naprava za stresanje: stresalnik ali enakovredna naprava; naprava za stresanje mora delovati tako, da so tla med tresenjem ves čas v suspenziji.

(c) Centrifuga: najbolje z visoko hitrostjo, npr. centrifugalna sila > 3 000 g, z uravnavano temperaturo, ki iz vodne raztopine lahko odstrani delce s premerom nad 0,2 μm. Posode je treba med stresanjem in centrifugiranjem zapreti s pokrovom, da se prepreči izhlapevanje in izguba vode; za čim manjšo adsorpcijo na pokrove je treba uporabiti deaktivirane pokrove, kot so s teflonom prevlečeni pokrovi z navojem.

(d) Neobvezno: naprava za filtriranje; filtri s porami 0,2 μm, sterilni, za enkratno uporabo. Posebna pozornost je potrebna pri izbiri materiala filtra, da ne bi na njem ostajala preskusna snov; za slabo topne preskusne snovi se ne priporočajo filtri iz organskih materialov.

(e) Analitski inštrumenti, primerni za merjenje koncentracije preskusne kemikalije.

(f) Laboratorijski sušilnik, v katerem je mogoče vzdrževati temperaturo 103 ^{o}C do 110 ^{o}C.

1.7.2 **Opredelitev in izbira tal**

Tla je treba opredeliti s tremi parametri, ki veljajo za prvenstveno odgovorne za adsorptivno sposobnost: organski ogljik, vsebnost gline in tekstura tal ter pH. Kot je bilo že omenjeno (glej Področje uporabe), lahko tudi druge fizikalno-kemijske lastnosti tal vplivajo na adsorpcijo/desorpcijo neke snovi in jih je treba v takih primerih upoštevati.

Metode, uporabljene za opredelitev tal, so zelo pomembne in imajo lahko precejšen vpliv na rezultate. Zato je priporočljivo pH tal meriti v raztopini 0,01 M $CaCl_2$ (raztopini, ki se uporablja pri preskušanju adsorpcije/desorpcije) po ustrezni metodi ISO (ISO-10390-1). Priporočljivo je tudi, da se druge ustrezne lastnosti tal določijo po standardnih metodah (na primer ISO „Handbook of Soil Analysis“); s tem se omogoči, da analiza sorpcijskih podatkov temelji na globalno standardiziranih parametrih za tla. Nekaj smernic za obstoječe standardne metode analize in opredeljevanja tal je na voljo v literaturi (50–52). Za umerjanje preskusnih metod za tla je priporočljiva uporaba referenčnih tal.

Smernice za izbiranje tal za poskuse adsorpcije/desorpcije so v tabeli 1. Sedem izbranih tal zajema tipe iz zmernih geografskih območij. Pri preskusnih snoveh, ki lahko ionizirajo, naj izbrana tla zajemajo širok razpon pH, da bi lahko ovrednotili adsorpcijo snovi v njeni ionizirani in neionizirani obliki. Navodila o tem, koliko različnih tipov tal uporabiti v različnih fazah preskusa, so navedena pod 1.9 „Izvedba preskusa“.

Če se da prednost drugim vrstam tal, jih je treba opredeliti z istimi parametri in morajo imeti podobne razlike v lastnostih kot tiste, opisane v tabeli 1, četudi niso popolnoma skladne z merili.

▼B

Tabela 1

Smernice za izbiranje vzorcev tal za adsorpcijo/desorpcijo

Tip tal	Razpon pH (v 0,01 M $CaCl_2$)	Vsebnost organskega ogljika (%)	Vsebnost gline (%)	Tekstura tal (1)
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	glina
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	glinasta ilovica
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	meljasta ilovica
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	ilovica
5	< 4,0–6,0 (2)	< 0,5–1,5 (2) (3)	< 10–15 (2)	ilovnat pesek
6	> 7,0	< 0,5–1,0 (2) (3)	40–65	glinasta ilovica/glina
7	< 4,5	> 10	< 10	pesek/ilovnat pesek

(1) Po FAO in ameriškem sistemu (85).
(2) Najbolje je, da imajo ustrezne spremenljivke vrednosti znotraj razpona. Če se pojavijo težave pri iskanju ustreznega talnega materiala, so sprejemljive tudi vrednosti pod navedenim minimumom.
(3) Tla z manj kot 0,3 % organskega ogljika lahko povzročijo motnje v korelaciji med vsebnostjo organskih snovi in adsorpcijo. Zato je priporočljivo uporabiti tla z vsebnostjo organskega ogljika najmanj 0,3 %.

1.7.3 **Zbiranje in shranjevanje vzorcev tal**

1.7.3.1 *Zbiranje*

Ne priporoča se nobena posebna tehnika vzorčenja ali orodja; tehnika vzorčenja je odvisna od namena študije (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Treba je upoštevati naslednje:

(a) potrebne so podrobne informacije o preteklosti mesta vzorčenja; to vključuje lokacijo, pokritost z vegetacijo, uporabo pesticidov in/ali gnojil, biološke dodatke ali naključno kontaminacijo. Treba je upoštevati priporočila standarda ISO o vzorčenju tal (ISO 10381-6) glede opisa mesta vzorčenja;

(b) mesto vzorčenja je treba definirati z UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ali zemljepisnimi koordinatami; s tem je v prihodnosti omogočen ponoven odvzem vzorca teh tal ali pa to lahko pomaga pri definiranju tal po različnih sistemih klasifikacije, uporabljenih v različnih državah. Poleg tega je treba odvzeti vzorec samo iz horizonta A do največje globine 20 cm. Zlasti, če je pri tipu tal št. 7 horizont O_h prisoten kot del tal, ga je treba pri vzorčenju vključiti.

Vzorce tal je treba prenašati v posodah in v temperaturnih razmerah, ki zagotavljajo, da se prvotne lastnosti tal bistveno ne spremenijo.

▼B

1.7.3.2 *Shranjevanje*

Najbolje je uporabiti tla, na sveže odvzeta na terenu. Samo če to ni mogoče, se lahko vzorec tal shrani pri temperaturi prostora, posušen na zraku. Nobena omejitev časa shranjevanja ni priporočena, vendar je treba tla, hranjena več kot tri leta, pred uporabo ponovno analizirati glede na njihovo vsebnost organskega ogljika, pH in CEC.

1.7.3.3 *Rokovanje z vzorci tal in njihova priprava na preskus*

Tla se posušijo na zraku pri temperaturi prostora (najbolje med 20 in 25 ^{o}C). Desagregacija (razdruževanje) naj se izvede s čim manjšo silo, tako da se prvotna tekstura tal čim manj spremeni. Tla se presejejo tako, da je velikost delcev < 2 mm; glede postopka presejanja se upoštevajo priporočila standarda ISO o vzorčenju tal (ISO 10381-6). Priporočena je previdna homogenizacija, saj se s tem poveča ponovljivost rezultatov. Vsebnost vlage v posameznem vzorcu tal se določi na treh alikvotnih delih s segrevanjem pri 105 ^{o}C dokler ni več pomembnih sprememb mase (sušenje do konstantne mase, približno 12 h). Pri vseh izračunih se masa tal nanaša na maso po sušenju, t.j. maso tal, brez vsebnosti vlage.

1.7.4 **Priprava preskusne snovi za aplikacijo na tla**

Preskusna snov se raztopi v 0,01 M raztopini $CaCl_2$ v destilirani ali deionizirani vodi, pri čemer se raztopina $CaCl_2$ uporabi kot vodna topilna faza za izboljšanje centrifugiranja in doseganje čim manjše kationske izmenjave. Najbolje je, da je koncentracija osnovne raztopine tri velikostne rede večja od meje detekcije uporabljene analitske metode. S tem pragom se zavaruje točnost meritev glede na metodologijo, ki jo ta metoda upošteva; poleg tega mora biti koncentracija osnovne raztopine pod topnostjo preskusne snovi v vodi.

Osnovno raztopino je najbolje pripraviti tik pred apliciranjem na vzorce tal, hraniti pa jo je treba zaprto v temi pri 4 ^{o}C. Čas hranjenja je odvisen od stabilnosti preskusne snovi in njene koncentracije v raztopini.

Samo pri slabo topnih snoveh (S_w < 10^{-4} g l^{-1}) je lahko potrebno uporabiti ustrezno topilo, če je preskusno snov težko raztopiti. To topilo: (a) naj bo tako, ki se meša z vodo, kot sta metanol ali acetonitril; (b) njegova koncentracija naj ne presega 1 % skupne prostornine osnovne raztopine in naj bo manjša od te koncentracije v raztopini preskusne snovi, ki bo prišla v stik s tlemi (najbolje manj kot 0,1 %); in (c) naj ne bo površinsko aktivna snov in naj ne bo podvrženo solvoliznim reakcijam s preskusno kemikalijo. Uporabo topila je treba navesti in utemeljiti pri poročanju o podatkih.

Druga možnost za slabo topne snovi je dodajanje preskusne snovi v preskusni sistem s primešanjem: preskusna snov se raztopi v organskem topilu, katerega alikvot se doda sistemu tal in 0,01 M raztopine $CaCl_2$ v destilirani ali deionizirani vodi. Vsebnost organskega topila v vodni fazi naj bo čim manjša in naj normalno ne presega 0,1 %. Težava pri primešanju iz organske raztopine je lahko neponovljivost glede prostornine. Tako lahko pride do dodatne napake, ker koncentracije preskusne snovi in pomožnega topila ne bodo enake pri vseh preskusih.

▼B

1.8 PREDPOGOJI ZA IZVEDBO PRESKUSA ADSORPCIJE/DESORPCIJE

1.8.1 **Analitska metoda**

Ključni parametri, ki lahko vplivajo na točnost meritev sorpcije, zajemajo točnost analitske metode pri analiziranju faze raztopine in adsorbirane faze, stabilnost in čistost preskusne snovi, doseganje sorpcijskega ravnotežja, velikost spremembe koncentracije raztopine, razmerje tla/raztopina in spremembe strukture tal med procesom uravnoteženja (35) (59–62). Nekaj primerov v zvezi z vprašanjem točnosti je navedenih v Dodatku 2.

Zanesljivost uporabljene analitske metode je treba preveriti pri območju koncentracij, ki se bodo verjetno pojavile v preskusu. Izvajalec poskusa naj svobodno razvije ustrezno metodo z ustrezno točnostjo, natančnostjo, ponovljivostjo, mejami detekcije in rekuperacijo. Smernice za izvedbo takega preskusa so dane s spodnjim poskusom.

Ustrezna prostornina 0,01 M $CaCl_2$, npr. 100 cm^3, se stresa 4 h z določeno količino, npr. 20 g, tal z visoko adsorptivnostjo t.j. tal z veliko vsebnostjo organskega ogljika in gline; te teže in prostornine so lahko različne glede na analitske potrebe, vendar je primerno izhodišče razmerje tla/raztopina 1:5. Zmes se centrifugira in vodna faza se lahko filtrira. Določena prostornina osnovne raztopine preskusne snovi se doda vodni fazi, da se doseže nominalna koncentracija v območju koncentracij, ki se bodo verjetno pojavile v preskusu. Ta prostornina naj ne presega 10 % končne prostornine vodne faze, da se narava raztopine pred uravnoteženjem čim manj spremeni. Raztopina se analizira.

Vključiti je treba slepi vzorec, ki ga sestavlja sistem tal in raztopine $CaCl_2$ (brez preskusne snovi) za preverjanje artefaktov pri analitski metodi in vplivov matriksa, ki jih povzročijo tla.

Analitske metode, ki se lahko uporabijo za merjenje sorpcije, zajemajo plinsko-tekočinsko kromatografijo (GLC), tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), spektrometrijo (npr. GC/masna spektrometrija, HPLC/masna spektromertrija) in tekočinsko scintilacijsko štetje (za radioaktivno označene snovi). Ne glede na uporabljeno analitsko metodo, velja za primerno, če je rekuperacija med 90 % in 110 %) nominalne vrednosti. Da bi bila po porazdelitvi mogoča detekcija in ovrednotenje, naj bodo meje detekcije analitske metode vsaj dva velikostna reda pod nominalno koncentracijo.

Lastnosti in meje detekcije analitske metode za izvajanje študij adsorpcije imajo pomembno vlogo pri določanju preskusnih pogojev in celotne eksperimentalne izvedbe preskusa. Ta metoda sledi splošni eksperimentalni poti ter daje priporočila in smernice za alternativne rešitve, kadar analitska metoda ali zmožnosti laboratorija omejujejo izvedbo.

▼B

1.8.2 **Izbira optimalnih razmerij tla/raztopina**

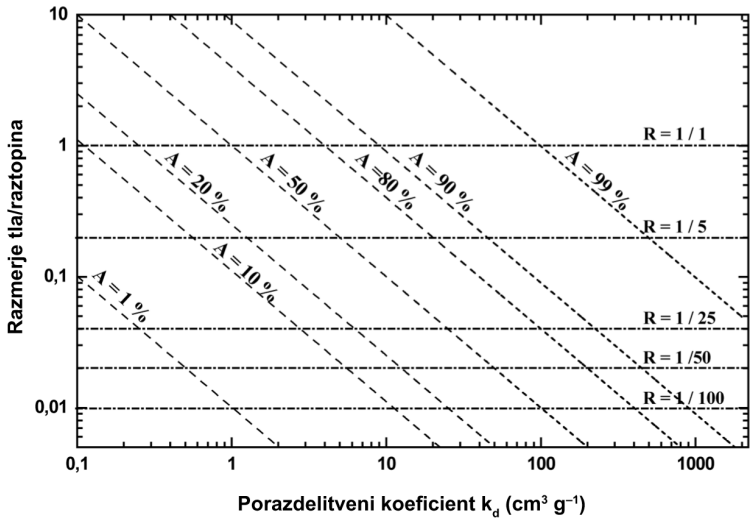
Izbira ustreznih razmerij tla/raztopino za študije sorptivnosti je odvisna od porazdelitvenega koeficienta K_d in želene relativne stopnje adsorpcije. Sprememba koncentracije snovi v raztopini določa statistično točnost meritve na osnovi oblike adsorpcijske enačbe in meje analitske metodologije pri zaznavanju koncentracije kemikalije v raztopini. Zato je v splošni praksi koristno določiti nekaj fiksnih razmerij, pri katerih je adsorbirani odstotek nad 20 % in najbolje nad 50 % (62), pri tem pa je treba paziti, da je koncentracija preskusne snovi v vodni fazi ves čas dovolj velika, da omogoča točne meritve. To je zlasti pomembno v primeru visokih adsorpcijskih odstotkov.

Primeren pristop k izbiranju ustreznih razmerij tla/raztopina temelji na oceni vrednosti K_d s predhodnimi študijami ali po uveljavljenih tehnikah ocenjevanja (Dodatek 3). Ustrezno razmerje se nato lahko izbere na podlagi grafičnega prikaza razmerja tla/raztopina v odvisnosti od K_d za fiksne odstotke adsorpcije (slika 1). V tem grafičnem prikazu se predpostavlja, da je adsorpcijska enačba linearna [1]. Uporabna odvisnost se dobi s preureditvijo enačbe (4) za K_d v obliko enačbe (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ali v njeni logaritemski obliki, ob predpostavki, da $R = m_{soil}/V_0$ and $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



Slika 1: Odvisnost med razmerji tla/raztopina in K_d pri različnih odstotkih adsorbirane preskusne snovi

[1] $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Slika 1 prikazuje potrebna razmerja tla/raztopina kot funkcija K_d za različne stopnje adsorpcije. Na primer, pri razmerju tla/raztopina 1:5 in K_d 20 bi prišlo do približno 80-odstotne adsorpcije. Da bi pri enakem K_d dobili 50-odstotno adsorpcijo, je treba uporabiti razmerje 1:25. Ta pristop k izbiranju ustreznih razmerij tla/raztopina omogoča preiskovalcu fleksibilnost, da lahko zadovolji potrebe preskusa.

Težavnejši primeri so tisti, kjer se kemikalija zelo dobro ali zelo slabo adsorbira. Kadar je adsorpcija nizka, je priporočeno razmerje tla/raztopina 1:1, vendar so pri nekaterih zelo organskih tipih tal lahko potrebna manjša razmerja, da dobimo blato. Pri analitski metodologiji je potrebna previdnost, da se izmerijo majhne spremembe v koncentraciji raztopine; drugače bo meritev adsorpcije netočna. Po drugi strani lahko pri zelo visokih porazdelitvenihih koeficientih K_d uporabimo lahko razmerje tla/raztopina do 1:100, da bi v raztopini ostala pomembna količina kemikalije. Vendar je treba paziti, da zagotovimo dobro mešanje, in omogočimo dovolj časa za vzpostavitev ravnotežja v sistemu. Druga možnost za obvladovanje teh ekstremnih primerov, ko ni primerne analitske metodologije, je napovedovanje vrednosti K_d z uporabo tehnik ocenjevanja, na primer na osnovi vrednosti P_{ow} (Dodatek 3). To je lahko uporabno zlasti pri slabo adsorbiranih/polarnih kemikalijah s $P_{ow} < 20$ in lipofilnih/zelo sorptivnih kemikalijah s $P_{ow} > 104$.

1.9 IZVEDBA PRESKUSA

1.9.1 **Preskusni pogoji**

Vsi preskusi se izvedejo pri normalni temperaturi in, če je mogoče, pri stalni temperaturi med 20 in 25 °C.

Pogoji centrifugiranja morajo omogočati odstranitev delcev iz raztopine, ki so večji od 0,2 μm. Ta velikost ustreza najmanjšemu delcu, ki še velja za trden delec, in je meja med trdnimi in koloidnimi delci. Smernice za določitev pogojev centrifugiranja so navedena v Dodatku 4.

Če centrifuga ne more zagotoviti odstranitve delcev, večjih od 0,2 μm, se lahko uporabi kombinacija centrifugiranja in filtriranja z 0,2 μm filtri. Ti filtri naj bodo iz primernega inertnega materiala, da se na njih ne bi izgubljala preskusna snov. V vsakem primeru je treba dokazati, da med filtracijo ne prihaja do izgub preskusne snovi.

1.9.2 **Stopnja 1 – Predhodna študija**

Namen predhodne študije je bil že naveden v poglavju Področje uporabe. Smernice za postavitev takega preskusa pa so dane s spodaj predlaganim preskusom.

1.9.2.1 *Izbira optimalnih razmerij tla/raztopina*

Uporabita se dva tipa tal in tri razmerja tla/raztopina (šest poskusov). En tip tal naj ima visoko vsebnost organskega ogljika in nizko vsebnost gline, drugi pa nizko vsebnost organskega ogljika in visoko vsebnost gline. Predlagana so naslednja razmerja tla/raztopina:

— 50 g tal in 50 cm^3 vodne raztopine preskusne snovi (razmerje 1/1),

▼B

— 10 g tal in 50 cm^3 vodne raztopine preskusne snovi (razmerje 1/5),

— 2 g tal in 50 cm^3 vodne raztopine preskusne snovi (razmerje 1/25).

Minimalna količina tal, s katero se lahko izvede poskus, je odvisna od laboratorijskih zmožnosti in učinkovitosti uporabljenih analitskih metod. Vendar je priporočljivo uporabiti vsaj 1 g, najbolje pa 2 g, da bi bili rezultati preskusa zanesljivi.

Kontrolni vzorec samo s preskusno snovjo v 0,01 M raztopini $CaCl_2$ (brez tal) se tretira po natančno enakem postopku kot preskusni sistem, da se preveri stabilnost preskusne snovi v raztopini $CaCl_2$ in njeno morebitno adsorpcijo na površine preskusnih posod.

Po en slepi vzorec na tip tal z enako količino tal in skupno prostornino 50 cm^3 0,01 M raztopine $CaCl_2$ (brez preskusne snovi) se tretirajo po enakem preskusnem postopku. To je namenjeno kontroli ozadja med analizo, da se zaznajo moteče snovi ali kontaminirana tla.

Vse poskuse, vključno s kontrolami in slepimi vzorci, je treba izvajati vsaj v dveh ponovitvah. Skupno število vzorcev, ki jih je treba pripraviti za študijo, se lahko izračuna glede na metodologijo, ki bo uporabljena.

Metode za predhodno študijo in glavno študijo so na splošno enake, kjer je ustrezno, so navedene izjeme.

Na zraku posušeni vzorci tal se uravnotežijo s stresanjem s prostornino vsaj 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ čez noč (12 h) pred dnem preskusa. Nato se doda določena količina osnovne raztopine preskusne snovi, da se končna prostornina dopolni do 50 cm^3. Ta količina dodane osnovne raztopine: (a) naj ne presega 10 % končne prostornine vodne faze 50 cm^3, da se narava raztopine pred uravnoteženjem čim manj spremeni; in (b) naj bo taka, da bo začetna koncentracija preskusne snovi v stiku s tlemi (C_o) vsaj dva velikostna reda večja od meje detekcije analitske metode; ta prag omogoča izvajanje točnih meritev, tudi če pride do močne adsorpcije (> 90 %), in kasnejšo določitev adsorpcijskih izoterm. Priporočljivo je tudi, da začetna koncentracija snovi (C_o), če je to mogoče, ne presega polovice njene meje topnosti.

Primer za izračun koncentracije osnovne raztopine (C_{st}) je naveden spodaj. Predpostavlja se meja detekcije pri 0,01 ug cm^{-3} in 90-odstotna adsorpcija; tako, da je najbolje, da je začetna koncentracija preskusne snovi v stiku s tlemi 1 ug cm^{-3} (dva velikostna reda nad mejo detekcije). Če predpostavljamo, da se doda največja priporočena prostornina osnovne raztopine, t.j. 5 cm^3 k 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ raztopine za uravnoteženje (= 10 % osnovne raztopine v 50 cm^3 skupne prostornine vodne faze), bi morala biti koncentracija osnovne raztopine 10 µg cm^{-3}; to je tri velikostne rede nad mejo detekcije analitske metode.

pH vodne faze se meri pred in po stiku s tlemi, saj ima pomembno vlogo v adsorpcij skem procesu, zlasti pri snoveh, ki lahko ionizirajo.

▼B

Zmes se stresa, dokler ni vzpostavljeno adsorpcijsko ravnotežje. Čas potreben za vzpostavitev ravnotežja v tleh je zelo različen glede na kemikalijo in tip tal; navadno zadostuje 24 h (77). V predhodni študiji se vzorci lahko zbirajo zaporedno v času 48 h mešanja (na primer po 4, 8, 24, 48 h). Vendar naj bodo časi analize fleksibilni ob upoštevanju delovnega razporeda v laboratoriju.

Za analiziranje preskusne snovi v vodni raztopini obstajata dve možnosti: (a) paralelna metoda in (b) serialna metoda. Poudariti je treba, da je pri paralelni metodi matematična obdelava rezultatov enostavnejša (Dodatek 5), čeprav je metoda eksperimentalno bolj zahtevna. Vendar je izbira metodologije prepuščena izvajalcu, ki mora pretehtati zmožnosti in sredstva laboratorija.

(a) Paralelna metoda: pripravijo se vzorci z enakim razmerjem tla/raztopina, toliko vzorcev, kot je časovnih intervalov, pri katerih se želi proučevati kinetiko adsorpcije. Po centrifugiranju in po želji po filtriranju se vodna faza prve epruvete v čim večji meri rekuperira in se izmeri po na primer 4 h, vodna faza druge epruvete po 8 h, tista iz tretje po 24 h itd.

(b) Serialna metoda: za vsako razmerje tla/raztopina se pripravita samo dva vzorca. V opredeljenih časovnih intervalih se zmes centrifugira, da se ločijo faze. V majhnem alikvotu vodne faze se takoj določi preskusna snov; nato se poskus nadaljuje s prvotno zmesjo. Če se po centrifugiranju izvede filtracija, mora imeti laboratorij možnost filtriranja majhnih vodnih alikvotov. Priporočeno je, da skupna prostornina odvzetih alikvotov ne presega 1 % skupne prostornine raztopine tako, da se razmerje tla/raztopina ne spremeni bistveno in da se ne zmanjša masa topljenca, ki je med preskusom na voljo za adsorpcijo.

Odstotek adsorpcije A_{t_i} se izračuna za vsako posamezno časovno točko (t_i) na osnovi nominalne začetne koncentracije in izmerjene koncentracije ob času vzorčenja (t_i), korigirane glede na vrednost slepega vzorca. Izdelajo se grafični prikazi A_{t_i} v odvisnosti od časa (slika 1 v Dodatku 5), da se oceni vzpostavitev ravnotežnega konstantnega nivoja ([1]). Izračuna se tudi vrednost K_d ob ravnotežju. Na osnovi te vrednosti K_d se iz slike 1 izberejo ustrezna razmerja tla/raztopina, tako da je odstotek adsorpcije nad 20 % in najbolje nad 50 % (61). Vse uporabljene enačbe in načela izdelave grafov so navedeni v poglavju „Podatki in poročanje“ in v Dodatku 5.

1.9.2.2 *Določanje časa adsorpcijskega ravnotežja in količine preskusne snovi, adsorbirane ob ravnotežju*

Kot je bilo že omenjeno, grafični prikazi A_{t_i} ali C_{aq}^{ads} v odvisnosti od časa omogočajo ocenitev vzpostavitve adsorpcijskega ravnotežja in količine preskusne snovi, adsorbirane ob ravnotežju. Sliki 1 in 2 v Dodatku 5 sta primera takih grafičnih prikazov. Čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja pove, koliko časa sistem potrebuje, da doseže konstanten nivo.

([1]) Za ocenjevanje vzpostavitve ravnotežnega konstantnega nivoja se lahko uporabijo tudi grafi koncentracije preskusne snovi v vodni fazi C_{aq}^{ads} v odvisnosti od časa (glej sliko 2 v Dodatku 5).

▼B

Če se za neka tla ne ugotovi konstantnega nivoja, temveč gre za stalno naraščanje, so za to lahko krivi dejavniki, kot sta biorazgradnja ali počasna difuzija. Biorazgradnja se lahko ugotovi s ponovitvijo poskusa s steriliziranim vzorcem tal. Če tudi v tem primeru ni dosežen konstanten nivo, mora izvajalec poiskati druge pojave, ki bi lahko bili vpleteni v njegovi študiji; to se lahko naredi z ustreznimi spremembami eksperimentalnih pogojev (temperatura, čas stresanja, razmerja tla/raztopina). Izvajalcu je prepuščeno, da odloči, ali nadaljevati s preskusnim postopkom, čeprav se ravnotežje morda ne bo vzpostavilo.

1.9.2.3 *Adsorpcija na površino preskusne posode in stabilnost preskusne snovi*

Nekatere informacije o adsorpciji preskusne snovi na površino preskusnih posod in o njeni stabilnosti se lahko pridobijo z analiziranjem kontrolnih vzorcev. Če se ugotovi izčrpanje snovi za več kot za standardno napako analitske metode, sta lahko vzrok abiotska razgradnja in/ali adsorpcija na površino preskusne posode. Ta dva pojava se lahko razločita s temeljitim izpiranjem sten posode z znano prostornino ustreznega topila in analiziranjem vsebnosti preskusne snovi v izpiralni raztopini za izpiranje. Če ni ugotovljena adsorpcija na površino posode, je izgubljanje dokaz za abiotsko nestabilnost preskusne snovi. Če je adsorpcija ugotovljena, je treba zamenjati material preskusne posode. Vendar podatkov o adsorpciji na površino preskusnih posod, dobljenih s tem poskusom, ni mogoče neposredno ekstrapolirati na preskus tla/raztopina. Prisotnost vzorca tal bo vplivala na to adsorpcijo.

Dodatne informacije o stabilnosti preskusne snovi je mogoče dobiti z določitvijo masne bilance izhodiščne snovi v odvisnosti od časa. To pomeni, da se analizira vsebnost preskusne snovi v vodni fazi, ekstraktu tal in na stenah preskusne posode. Razlika med maso dodane preskusne kemikalije in vsoto mas preskusne kemikalije v vodni fazi, ekstraktih tal in na stenah preskusne posode je enaka razgrajeni in/ali izhlapeli in/ali neekstrahirani masi. Za določitev masne bilance bi moralo biti adsorpcijsko ravnotežje vzpostavljeno v času trajanja poskusa.

Masna bilanca se določi za oba tipa tal in za eno razmerje tla/raztopina, pri katerem v ravnotežju pride do izgubljanja nad 20 % in najbolje nad 50 %>. Ko je poskus za določitev razmerja končan z analiziranjem zadnjega vzorca vodne faze po 48 h, se faze ločijo s centrifugiranjem in, po želji, s filtracijo. Vodna faza se v čim večji meri rekuperira, tlom pa se za ekstrakcijo preskusne snovi doda primerno ekstrakcijsko topilo (z ekstrakcijskim koeficientom najmanj 95 %). Priporočeni sta vsaj dve zaporedni ekstrakcij i. Določi se količina preskusne snovi v ekstraktih tal in ekstraktih preskusnih posod in izračuna se masna bilanca (enačba 10, Podatki in poročanje). Če je manjša od 90 %>, preskusna snov velja za nestabilno v času trajanja preskusa. Vendar se lahko študija nadaljuje ob upoštevanju neobstojnosti preskusne snovi; v tem primeru je priporočljivo analizirati obe fazi v glavni študiji.

▼B

1.9.2.4 *Stopnja 2 – Kinetika adsorpcije pri eni koncentraciji preskusne snovi*

Uporabi se pet tipov tal, izbranih iz tabele 1. Med teh pet tipov je, če je primerno, koristno vključiti nekatere ali vse tipe tal, uporabljene v predhodni študiji. V tem primeru stopnje 2 ni treba ponoviti za tipe tal, uporabljene v predhodni študiji.

Čas potreben za vzpostavitev ravnotežja, razmerje tla/raztopina, teža vzorca tal, prostornina vodne faze v stiku s tlemi in koncentracija preskusne snovi v raztopini se izberejo na podlagi izsledkov predhodne študije. Analizo je najbolje opraviti približno po 2, 4, 6, 8 (po možnosti tudi 10) in 24 urah stika; čas stresanja se lahko podaljša na največ 48 h, če kemikalija zahteva daljši čas za vzpostavitev ravnotežja glede na rezultate določanja razmerja. Vendar se časi analize lahko pretehtajo s fleksibilnostjo.

Vsak poskus (en tip tal in ena raztopina) se izvede vsaj v dveh ponovitvah, da se omogoči oceno variance rezultatov. V vsakem poskusu je en slepi vzorec. Sestavljen je iz vzorca tal in 0,01 M raztopine $CaCl_2$ brez preskusne snovi ter ima tako težo in prostornino, kot sta uporabljeni v preskusu. Kontrolni vzorec, ki vsebuje samo preskusno snov v 0,01 M raztopini $CaCl_2$ (brez tal), se tretira po enakem preskusnem postopku in služi kot zaščita pred nepričakovanim.

Odstotek adsorpcije se izračuna za vsak čas A_{t_i} in/ali časovni interval A_{t_i} (glede na potrebe) in se grafično prikaže v odvisnosti od časa. Izračunata se tudi porazdelitveni koeficient K_d ob ravnotežju in adsorpcijski koeficient normiran na organski ogljik K_{oc} (za nepolarne organske kemikalije).

Rezultati preskusa kinetike adsorpcije

Linearna vrednost K_d navadno točno opiše obnašanje pri sorpciji v tleh (35) (78) in izraža inherentno mobilnost kemikalij v tleh. Na primer, na splošno kemikalije s $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} veljajo za kvalitativno mobilne. Podobno so MacCall et al. (16) razvili sistem razvrščanja po mobilnosti na osnovi vrednosti K_{oc}. Poleg tega obstajajo sistemi razvrščanja glede na izluževanje, ki temeljijo na odnosu med K_{oc} DT-50 ([1]) (32) (79).

Glede na študije analize napake (61) se vrednosti K_d pod 0,3 cm^3 g^{-1} ne dajo točno oceniti iz zmanjšanja koncentracije v vodni fazi, četudi se uporabi najugodnejše (z vidika točnosti) razmerje tla/raztopina, t.j. 1:1. Vtem primeru je priporočljiva analiza obeh faz, tal in raztopine.

([1]) DT-50: čas razgradnje 50 % preskusne snovi.

▼B

Glede na zgornje opombe je priporočljivo, da se študija adsorptivnega obnašanja kemikalije v tleh in njene potencialne mobilnosti nadaljuje z določitvijo Freundlichovih adsorpcijskih izoterm za te sisteme, za katere je mogoča točna določitev K_d po eksperimentalnem protokolu iz te preskusne metode. Točna določitev je mogoča, če je rezultat pomnožitve K_d z razmerjem tla/raztopina > 0,3, kadar meritve temeljijo na zmanjševanju koncentracije v vodni fazi (posredna metoda), oziroma > 0,1, kadar se analizirata obe fazi (neposredna metoda) (61).

1.9.2.5 *Stopnja 3 – Adsorpcijske izoterme in kinetika desorpcije/desorpcijske izoterme*

1.9.2.5.1 Adsorpcijske izoterme

Uporabi se pet koncentracij preskusne snovi, ki najbolje da zajemajo dva velikostna reda; pri izbiri teh koncentracij se upoštevajo topnost v vodi in posledične koncentracije vodnega ravnotežja. Med študijo je potrebno ohranjati isto razmerje tla/raztopina za posamezni tip tal. Preskus adsorpcije se izvede, kakor je opisano zgoraj, z edino razliko, da se vodna faza analizira samo enkrat ob času, potrebnem za vzpostavitev ravnotežja, kakor je že bilo določeno v stopnji 2. Določijo se ravnotežne koncentracije v raztopini, adsorbirana količina pa se izračuna iz izgubljanja preskusne snovi v raztopini ali z neposredno metodo. Adsorbirana masa na enoto mase tal se prikaže grafično kot funkcija ravnotežne koncentracije preskusne snovi (glej poglavje „Podatki in poročanje“).

Rezultati poskusa adsorpcijskih izoterm

Med doslej predlaganimi matematičnimi modeli adsorpcije se za opisovanje adsorpcijskih procesov najpogosteje uporablja Freundlichova izoterma. Bolj podrobne informacije o razlagi in pomenu adsorpcij skih modelov so na voljo v literaturi (41) (45) (80) (81) (82).

Opomba: Treba je omeniti, da je primerjava vrednosti K_F (Freundlichov adsorpcijski koeficient) za različne snovi mogoča samo, če so te vrednosti K_F izražene v enakih enotah (83).

1.9.2.5.2 Kinetika desorpcije

Namen tega preskusa je proučiti, ali se kemikalija reverzibilno ali ireverzibilno adsorbira na tla. Ta podatek je pomemben, saj ima tudi desorpcijski proces pomembno vlogo pri obnašanju kemikalije v tleh. Poleg tega so podatki o desorpciji koristni vhodni podatki pri računalniškem modeliranju izluževanja in odtekanja raztopljenih snovi. Če se želi opraviti študija desorpcije, je priporočljivo, da se spodaj opisana študija izvede za vsak sistem, za katerega je bila v prejšnjem preskusu kinetike desorpcije mogoča točna določitev K_d.

Kot pri študiji kinetike desorpcije, obstajata dve možnosti izvajanja poskusa kinetike desorpcije: (a) paralelna metoda in (b) serialna metoda. Izbira metodologije je prepuščena izvajalcu, ki mora pretehtati zmožnosti in sredstva laboratorija.

▼B

(a) Paralelna metoda: za vsak tip tal, ki se izbere za študijo desorpcije, se pripravijo vzorci z enakim razmerjem tla/raztopina, in sicer toliko vzorcev, kolikor je časovnih intervalov, v katerih se želi proučevati kinetika desorpcije. Najbolje je uporabiti enake časovne intervale kot pri poskusu kinetike adsorpcije; vendar se lahko skupni čas ustrezno podaljša, da se lahko v sistemu vzpostavi desorpcijsko ravnotežje. Za vsak preskus (en tip tal, ena raztopina) se pripravi en slepi vzorec. Sestavljen je iz vzorca tal in 0,01 M raztopine $CaCl_2$ brez preskusne snovi ter ima težo in prostornino, enaki tistima v preskusu. Kot kontrolni vzorec se po enakem preskusnem postopku tretira preskusna snov v 0,01 M raztopini $CaCl_2$ (brez tal). Vse zmesi tal z raztopino se stresajo, dokler se ne vzpostavi adsorpcijsko ravnotežje (kot je bilo določeno zgoraj v stopnji 2). Nato se faze ločijo s centrifugiranjem in vodne faze se v čim večji meri odstranijo. Prostornina odstranjene raztopine se nadomesti z enako prostornino 0,01 M $CaCl_2$ brez preskusne snovi in nove zmesi se zopet stresajo. Vodna faza v prvi epruveti se v čim večji meri rekuperira in se izmeri po na primer 2 h, tista v drugi epruveti po 4 h, tista v tretji po 6 h itd., dokler se ne vzpostavi desorpcijsko ravnotežje.

(b) Serijska metoda: po preskusu kinetike adsorpcije se zmes centrifugira in vodna faza v čim večji meri odstrani. Prostornina odstranjene raztopine se nadomesti z enako prostornino 0,01 M $CaCl_2$ brez preskusne snovi. Nova zmes se stresa, dokler ni vzpostavljeno desorpcijsko ravnotežje. V tem času se v določenih časovnih intervalih zmes centrifugira, da se ločijo faze. V majhnem alikvotu vodne faze se takoj analizira vsebnost preskusne snovi; nato se preskus nadaljuje s prvotno zmesjo. Prostornina posameznega alikvota naj bo manjša od 1 % skupne prostornine. Enaka količina sveže raztopine 0,01 M $CaCl_2$ se doda zmesi, da se ohrani razmerje tla/raztopina, stresanje pa se nadaljuje do naslednjega časovnega intervala.

Odstotek desorbcije se izračuna za vsak čas (D_{t_i}) ali časovni interval ($D_{\Delta t_i}$) (glede na potrebe študije) in grafično prikaže v odvisnosti od časa. Izračuna se tudi desorpcijski koeficient K_{des} ob ravnotežju. Vse uporabljene enačbe so navedene v poglavju Podatki in poročanje in Dodatku 5.

Rezultati preskusa kinetike desorpcije

Skupni grafični prikazi odstotkov desorpcije (D_{t_i}) in adsorpcije ($A_{\Delta t_i}$) v odvisnosti od časa omogočajo ocenitev reverzibilnosti adsorpcijskega procesa. Če se desorpcijsko ravnotežje vzpostavi tudi v dvakrat daljšem času od adsorpcij skega ravnotežja in če je skupna desorpcija večja od 75 % adsorbirane količine, velja adsorpcij a za reverzibilno.

1.9.2.5.3 Desorpcijske izoterme

Freundlichove desorpcij ske izoterme se določajo na tleh, uporabljenih pri preskusu adsorpcij skih izoterm. Preskus desorpcije se izvede, kakor je opisano v poglavju „Kinetika desorpcije“, z edino razliko, da se vodna faza analizira samo enkrat, ob desorpcij skem ravnotežju. Izračuna se količina desorbirane preskusne snovi. Vsebnost preskusne snovi, ki ostane adsorbirana na tleh ob desorpcij skem ravnotežju, se grafično prikaže kot funkcija ravnotežne koncentracije preskusne snovi v raztopini (glej poglavje Podatki in poročanje ter Dodatek 5).

▼B

2. **PODATKI IN POROČANJE**

Analitski podatki se prikažejo v obliki tabel (glej Dodatek 6). Navedejo se posamezne meritve in izračunana povprečja. Dodajo se grafični prikazi adsorpcij skih izoterm. Izračuni se opravijo, kot je opisano spodaj.

Za namen preskusa velja, da je teža 1 cm^3 vodne raztopine 1 g. Razmerje tla/raztopina se lahko z isto številko izrazi v enotah m/m ali m/V.

2.1 ADSORPCIJA

Adsorpcija A_{t_i} je opredeljena kot odstotek snovi, adsorbirane na tla, glede na količino na začetku preskusa, v preskusnih pogojih. Če je preskusna snov stabilna in se bistveno ne adsorbira na stene posode, se A_{t_i} izračuna za vsak čas t_i po enačbi:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \quad (3)$$

pri čemer je:

A_{ti} = odstotek adsorpcije ob času t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa preskusne snovi, adsorbirane na tla ob času t_i (μg);

m_0 = masa preskusne snovi v epruveti na začetku preskusa (μg).

Podrobne informacije o izračunavanju odstotka A_{t_i} pri paralelni in serijski metodi so navedene v Dodatku 5.

Porazdelitvenii koeficient K_d je razmerje med vsebnostjo snovi v fazi tal in masno koncentracijo snovi v vodni raztopini v preskusnih pogojih, ko je doseženo adsorpcijsko ravnotežje.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

pri čemer je:

$C_s^{ads}(eq)$ = vsebnost snovi, adsorbirane na tla ob adsorpcijskem ravnotežju (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = masna koncentracija snovi v vodni fazi ob adsorpcijskem ravnotežju (μg cm^{-3}). Ta koncentracija se določi analitsko ob upoštevanju vrednosti, dobljenih pri slepem vzorcu;

$m_s^{ads}(eq)$ = masa snovi, adsorbirane na tla ob adsorpcijskem ravnotežju (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa snovi v raztopini ob adsorpcijskem ravnotežju (μg);

m_{soil} = količina talne faze, izražena v suhi masi tal (g)

V_0 = začetna prostornina vodne faze v stiku s tlemi (cm^3).

Odnos med A_{eq} in K_d se navede z:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

pri čemer je:

A_{eq} = odstotek adsorpcije ob adsorpcijskem ravnotežju, %.

Adsorpcijski koeficient normiran na organski ogljik K_{oc}; povezuje porazdelitveni koeficient K_d z vsebnostijo organskega ogljika v vzorcu tal:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

pri čemer je:

%OC = odstotek organskega ogljika v vzorcu tal (g g^{-1}).

Koeficient K_{oc} predstavlja eno samo vrednost, ki označuje porazdelitev večinoma nepolarnih organskih kemikalij med organski ogljik v tleh ali usedlinah in vodi. Adsorpcija teh kemikalij je v korelaciji z organsko vsebnostjo sorptivnih trdnih snovi (7); tako so vrednosti K_{oc} odvisne od specifičnih lastnosti huminskih frakcij, ki se precej razlikujejo po zmožnosti sorpcije zaradi razlik v izvoru, genezi itd.

2.1.1 **Adsorpcijske izoterme**

Enačba Freundlichovih adsorpcij skih izoterm predstavlja odvisnost med količino adsorbirane preskusne snovi in koncentracijo preskusne snovi v raztopini ob ravnotežju (enačba 8).

Podatki se obdelajo kot pri „Adsorpciji“ in za vsako epruveto se izračuna vsebnost preskusne snovi, adsorbirane na tla po preskusu adsorpcije ($C_s^{ads}(eq)$, drugje navedeno kot x/m). Predpostavlja se, da je bilo ravnotežje vzpostavljeno in da $C_s^{ads}(eq)$predstavlja ravnotežno vrednost:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpcijska enačba je (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ali v linearni obliki:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

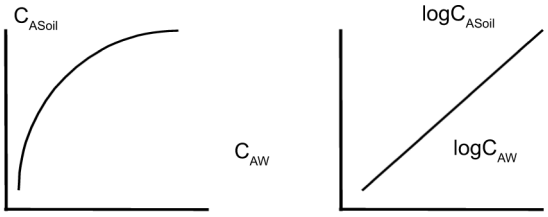
pri čemer je:

K_F^{ads} = Freundlichov adsorpcijski koeficient; njegova dimenzija je $cm^3\ g^{-1}$ samo pri 1/n = 1; v vseh drugih primerih se nagib 1/n vpelje v dimenziji K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$);

n = regresijska konstanta; 1/n ima navadno vrednost med 0,7 in 1,0 in kaže na to, da so podatki o sorpciji pogosto rahlo nelinearni.

Enačbi (8) in (9) se grafično prikažeta in vrednosti K_F^{ads} in 1/n se izračunajo z regresijsko analizo po enačbi 9. Izračuna se tudi korelacijski koeficient r^2 logaritemske enačbe. Primer takih grafov na sliki 2.

▼B



Slika 2: Freundlichova adsorpcijska krivulja, normalna in linearizirana

2.1.2 **Masna bilanca**

Masna bilanca („Mass balance MB“) je opredeljena kot odstotek snovi, ki jo je mogoče analitično rekuperirati po preskusu adsorpcije, glede na nominalno količino snovi na začetku preskusa.

Obdelava podatkov je drugačna, če se topilo popolnoma meša z vodo. V primeru topila, ki se meša z vodo, se lahko za določitev količine snovi, rekuperirane z ekstrakcijo s topilom, uporabi obdelava podatkov, opisana pod „Desorpcija“. Če se topilo manj meša z vodo, je treba določiti rekuperirano količino.

Masna bilanca (MB) za adsorpcijo se izračuna, kakor sledi; predpostavlja se, da izraz (m_E) ustreza vsoti mas preskusnih kemikalij, ekstrahiranih iz tal in površin preskusne posode z organskim topilom:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

pri čemer je:

MB = masna bilanca (%),

m_E = skupna masa preskusne snovi, ekstrahirane iz tal in sten preskusne posode v dveh fazah (μg),

C_0 = začetna masna koncentracija preskusne raztopine v stiku s tlemi (μg cm^{-3}),

V_{rec} = prostornina supernatanta, rekuperiranega po adsorpcijskem ravnotežju (cm^{-3}).

2.2 DESORPCIJA

Desorpcija (D) je opredeljena kot odstotek desorbirane preskusne snovi glede na količino prej adsorbirane snovi v preskusnih pogojih:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

pri čemer je:

D_{ti} = odstotek desorpcije ob času t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masa preskusne snovi, desorbirane s tal ob času t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = masa preskusne snovi, adsorbirane na tla ob adsorpcijskem ravnotežju (μg)

Podrobne informacije o izračunavanju odstotka desorpcije D_{t^i} pri paralelni in serijski metodi so navedene v Dodatku 5.

Navidezni desorpscijski koeficient (K_{des}) je v preskusnih pogojih razmerje med vsebnostjo snovi, ki ostane v talni fazi, in masno koncentracijo desorbirane snovi v vodni raztopini, ko je doseženo desorpcijsko ravnotežje:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

pri čemer je:

K_{des} = desorpscijski koeficient ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = skupna masa preskusne snovi, desorbirane ob desorpcijskem ravnotežju (μg);

V_T = skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi med preskusom kinetike desorpcije (cm^3).

Navodila za izračun $m_{aq}^{des}(eq)$ so v dodatku 5 pod naslovom „Desorpcija“.

Opomba

Če je bil že opravljeni preskus adsorpcije izveden po paralelni metodi, velja, da je prostornina V_T v enačbi 12 enaka V_o.

2.2.1 **Desorpcijske izoterme**

Enačba Freundlichovih desorpcijskih izoterm odvisnost med vsebnostjo preskusne snovi, ki ostane adsorbirana na tleh, in koncentracijo preskusne snovi v raztopini ob desorpcij skem ravnotežju (enačba 16).

Za vsako epruveto se vsebnost snovi, ki ostane adsorbirana na tleh ob desorpcij skem ravnotežju, izračuna, kakor sledi:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ je opredeljen kot:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

pri čemer je:

$C_s^{des}(eq)$ = vsebnost preskusne snovi, ki ostane adsorbirana na tla ob desorpcijskem ravnotežju (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = masa snovi, določena analitsko v vodni fazi ob desorpcijskem ravnotežju (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = masa preskusne snovi, ki ostane od adsorpcijskega ravnotežja zaradi nepopolne nadomestitve prostornine (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masa snovi v raztopini ob adsorpcijskem ravnotežju (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = prostornina raztopine, vzete iz epruvete za meritev preskusne snovi ob desorpcijskem ravnotežju (cm^3);

V_R = prostornina supernatanta, odstranjenega iz epruvete po vzpostavitvi adsorpcijskega ravnotežja in nadomeščenega z enako prostornino 0,01 M raztopine $CaCl_2$ (cm^3);

Freundlichova desorpcijska enačba je (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

ali v linearni obliki:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

pri čemer je:

K_F^{des} = Freundlichov desorpcijski koeficient;

n = regresijska konstanta;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = masna koncentracija snovi v vodni fazi ob desorpcijskem ravnotežju (μg cm^{-3}).

Enačbi 16 in 17 se lahko prikažeta grafično in vrednosti $K_F{}^{des}$ in 1/n se izračunata z regresijsko analizo po enačbi 17.

Opomba:

Če je Freundlichov adsorpcijski ali desorpcijski eksponent 1/n enak 1, bo Freundlichova ravnotežna konstanta adsorpcije ali desorpcije (vezalna konstanta) (K_F^{ads} and K_F^{des}) naka konstanti adsorpcijskega ali desorpcijskega ravnotežja (K_d and K_{des}), kot je primerno, grafi C_s v odvisnosti od C_{aq} pa bodo linearni. Če eksponenti niso enaki 1, bodo grafični prikazi C_s v odvisnosti od C_{aq} nelinearni, adsorpcijske in desorpcijske konstante pa se bodo spreminjale glede na izoterme.

2.2.2 **Poročilo o preskusu**

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

— popolno identifikacijo uporabljenih vzorcev tal, vključno z:

— geografsko oznako mesta (zemljepisna širina, zemljepisna dolžina),

— datumom vzorčenja,

▼B

— vrsto rabe (npr. kmetijsko zemljišče, gozd itd.),

— globino vzorčenja,

— vsebnostjo peska/mulja/gline, pH-vrednostmi (v 0,01 M $CaCl_2$),

— vsebnostjo organskega ogljika,

— vsebnostjo organskih snovi,

— vsebnostjo dušika,

— razmerjem C/N,

— kationsko izmenjalno kapaciteto (mmol/kg),

— vsemi informacijami v zvezi z zbiranjem in shranjevanjem vzorcev tal,

— kadar je primerno, vsemi relevantnimi informacijami za razlago adsorpcije/desorpcije preskusne snovi,

— sklici na metode, uporabljene za določanje posameznih parametrov,

— informacije o preskusni snovi, kakor je primerno,

— temperaturo preskusov,

— pogoje centrifugiranja,

— analitski postopek, uporabljen za analiziranje preskusne snovi,

— utemeljitev morebitne uporabe topila za pripravo osnovne raztopine preskusne snovi,

— razlage popravkov izračunov, če je ustrezno,

— podatke v skladu z obrazcem (Dodatek 6) in grafične prikaze,

— vse informacije in opažanja, koristne za razlago rezultatov preskusa.

4. **LITERATURA**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).

(5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, str. 83–122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, str. 31–44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29–35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, 185–190.

(18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, 524–528.

(19) Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901–932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137–157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric., 18, 269–273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, 45–52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961–971.

(25) Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247–258.

(26) Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143–154.

(27) Hamaker J.W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135–172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732–210.

(29) Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49–143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, 37–44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297–325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339–357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, 340–350.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, 389–395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80–101,

(36) Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 572–576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. J. Agri. Food Chem., 17, 667–668.

(38) Briggs G.G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

(40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, 243–246.

(41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, 29–92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222–234.

(43) Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, 833–846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. Safety 21, 1–17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, str. 49–143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19:67–69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, 454–457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc., 34, 353–354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., 109–138.

(61) Boesten, J.J.T.I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, 31–41.

(62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“ Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26–29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, 227–231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ.Qual., 10(3), 382–386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), 227–231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297–312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), 109–116.

(68) Lyman W.J. , Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78–115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, 831–832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38–42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), 833–846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité“. Revue de l'Agric., 34 (4), 319–322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), 1373–1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), 2341–2352.

(77) Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, str. 29–36.

(78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297–325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, 14–32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. J. Chem. Soc., 3973–93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption“. Ann. Agron. 31: 239–251.

(83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13–15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

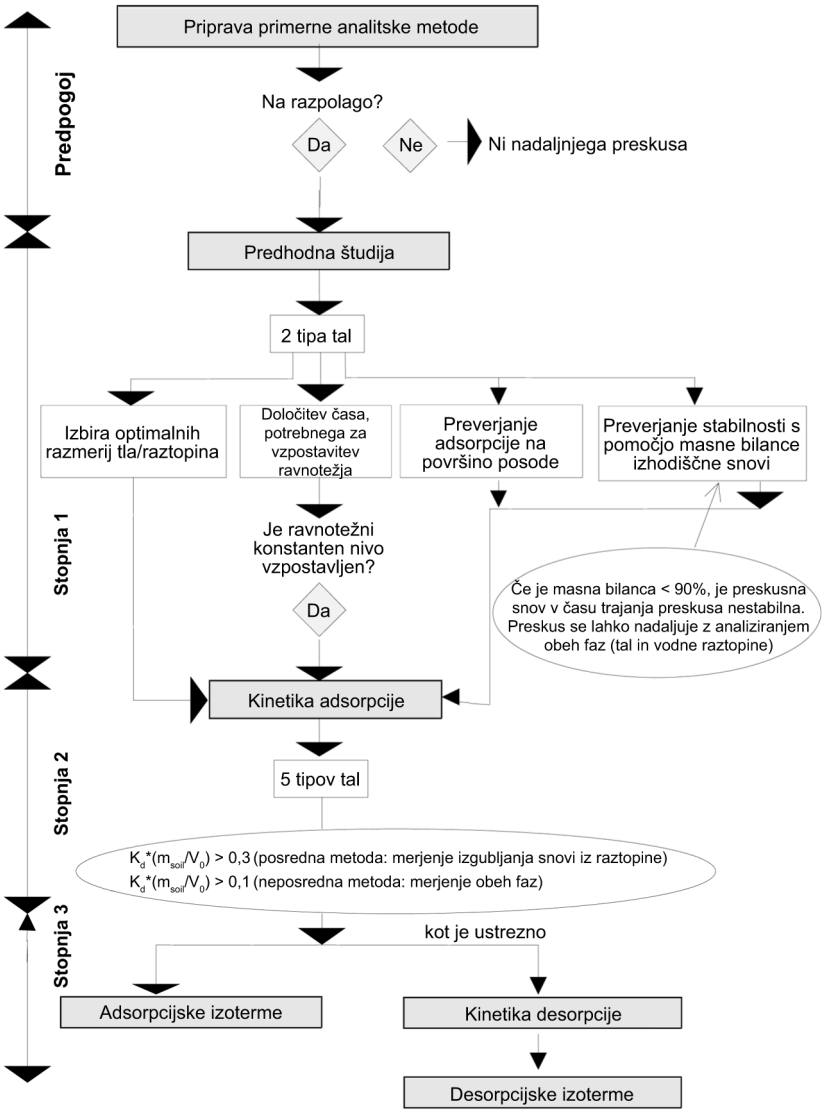
(84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

DODATEK 1

Shema preskusa



▼B

DODATEK 2

VPLIV TOČNOSTI ANALITSKE METODE IN SPREMEMBE KONCENTRACIJE NA TOČNOST REZULTATOV ADSORPCIJE

Iz naslednje tabele (84) je očitno, da pri zelo majhni razhki med začetno maso (m_o = 110 µg) in ravnotežno maso ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg) preskusne snoví v raztopini. 5 % napaka v merjenju ravnotežne koncentracije povzroči 50 % napako pri izračunavanja mase soovi, adsorbirane na tla ($m_s^{ads}(eq)$) and of 52,4 % napako pri izračunavanju K_d.

Količina tal m_{soil} m_{soil} = 10 g

Prostornina raztopine V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	ZA A = 9 %							
m_0 = 110 µg or C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	Dejanska vrednost	10	1,00	Dejanska vrednost	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	ZA A = 55 %							
m_0= 110 µg or C_0= 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	Dejanska vrednost	60,0	6,00	Dejanska vrednost	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	ZA A = 99 %							
m_0 = 110 µg or C_0= 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	Dejanska vrednost	108,9	10,89	Dejanska vrednost	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}}. \quad Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)_{V_0}}{m_{aq}^{ads}(eq)^{m_{soil}}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = masa preskusne snovi v talni fazi ob ravnotežju, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa preskusne snoví vodni fazi ob ravnotežju, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = vsebnost preskisne snovi v talni fazi ob ravnotežju, µg g^{-1};

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = masna konceutracija preskusne snovi v vodili fazi ob ravnotežju. µg cm^{-3};

R = analitska napaka pri dolocanju $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = izračunana napaka zaradi analitske napake R.

▼B

DODATEK 3

TEHNIKE OCENJEVANJA K_d

1. Tehnike ocenjevanja omogočajo napovedovanje K_d na podlagi korelacij z, na primer, vrednostmi P_{ow} (12) (39) (63–68), podatki o topnosti v vodi (12) (19) (21) (39) (68–73) ali podatki o polarnosti, dobljenimi z uporabo HPLC z obrnjeno fazo (74–76). Kakor je prikazano v tabelah 1 in 2, se iz teh enačb izračuna K_{oc} ali K_{om} in nato, posredno, K_d iz enačb:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. Koncept teh korelacij temelji na dveh predpostavkah: (1) na adsorpcijo snovi v največji meri vplivajo organske snovi v tleh; in (2) vpletene interakcije so večinoma nepolarne. Zaradi tega te korelacije: (1) niso uporabne za polarne snovi ali so zanje uporabne samo do neke mere, in (2) niso uporabne v primerih, ko je vsebnost organskih snovi v tleh zelo majhna (12). Poleg tega, čeprav so bile med P_{ow} in adsorpcijo sicer ugotovljene zadovoljive korelacije, tega ni mogoče trditi za odnos med topnostjo v vodi in obsegom adsorpcije (19) (21); dosedanje študije si zelo nasprotujejo.

3. Nekaj primerov korelacije med adsorpcijskim koeficientom in porazdelitvenim koeficientom oktanol/voda ter topnostjo v vodi je navedenih v tabeli 1 oziroma 2.

Tabela 1

Primeri korelacij med adsorpcij skim porazdelitvenimim koeficientom in porazdelitvenim koeficientom oktanol/voda; za dodatne primere glej (12) (68)

Snovi	Korelacije	Avtorji
Substituirane sečnine	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatske klorirane	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Razni pesticidi	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl in Mingelgrin (1984) (66)
Aromatski ogljikovodiki	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles in Mantoura (1987) (67)

Tabela 2

Primeri korelacij med adsorpcijskim porazdelitvenim koeficientom in topnostjo v vodi; za dodatne primere glej (68) (69)

Spojine	Korelacije	Avtorji
Razni pesticidi	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl in Mingelgrin (1984) (66)
Alifatske, aromatske klorirane snovi	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Ciklične, alifatske aromatske snovi	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Razne spojine	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

DODATEK 4

IZRAČUNI ZA DOLOČITEV POGOJEV CENTRIFUGIRANJA

1. Čas centrifugiranja se izračuna po naslednji enačbi ob predpostavki kroglastih delcev:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Za poenostavitev so vsi parametri opisani z enotami, ki niso enote SI (g, cm).

pri čemer je:

ω = hitrost vrtenja (=2 π rpm/60), rad s^{-1};

rpm = vrtljaji na minuto;

η = viskoznost raztopine, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = polmer delcev, cm;

ρ_s = gostota tal, g cm^{-3};

ρ_{aq} = gostota raztopine, g cm^{-3};

R_t = razdalja od središča rotorja centrifuge do gladine raztopine v centrifugirki, cm;

R_b = razdalja od središča rotorja centrifuge do dna centrifugirke, cm;

R_b-R_t = dolžina zmesi tla/raztopina v centrifugirki, cm.

V splošni praksi se uporabljajo dvakratni izračunani časi za zagotovitev popolne ločitve.

2. Enačbo (1) je mogoče še bolj poenostaviti, če predpostavimo, da sta viskoznost (η) in gostota (ρ_{aq}) raztopine enaki viskoznosti in gostoti vode pri 25 °C; torej, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}cm^{-1}$ IN ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3}.

Nato se izračuna čas centrifugiranja po enačbi (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Iz enačbe 2 postane očitno, da sta pri določanju pogojev centrifugiranja, t.j. časa (t) in hitrosti (rpm) pomembna dva parametra, za ločitev delcev specifične velikosti (v našem primeru s polmerom 0,1 μm): (1) gostota tal in (2) dolžina zmesi v centrifugirki (R_b-R_t), oz. razdalja, ki jo prepotuje delec od gladine raztopine do dna centrifugirke; seveda je pri fiksni prostornini dolžina zmesi v centrifugirki odvisna od kvadrata polmera centrifugirke.

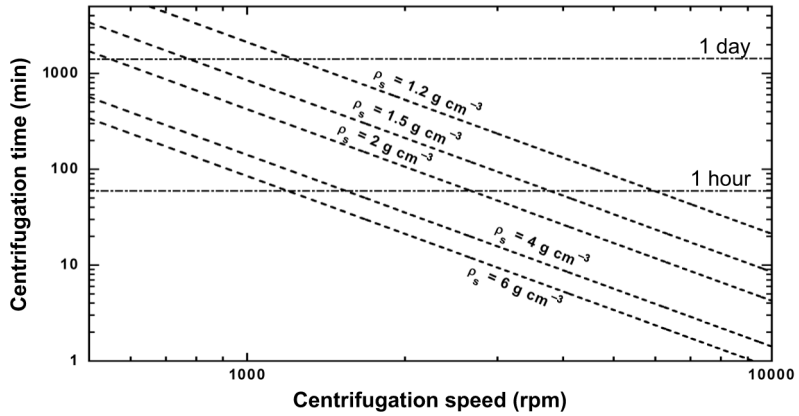
4. Slika 1 prikazuje spreminjanje časa centrifugiranja (t) v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja (rpm) pri različnih gostotah tal (p_s) (slika 1a) in različnih dolžinah zmesi v centrifugirkah (slika 1b). Iz slike 1a je vpliv gostote tal očiten; na primer, pri klasičnem centrifugiranju s 3 000 rpm je čas centrifugiranja približno 240 minut za gostoto tal 1,2 g cm^3, za gostoto 20 g cm^3 pa je samo 50 minut. Podobno slika lb kaže, da je pri klasičnem centrifugiranju s 3 000 rpm čas centrifugiranja približno 50 minut, če je dolžina zmesi 10 cm, in samo 7 minut pri dolžini 1 cm. Vendar je pomembno najti optimalen odnos med centrifugiranjem, ki zahteva najmanjšo možno dolžino, in čim lažjim ločevanjem faz po centrifugiranju.

▼B

5. Poleg tega je pri določanju eksperimentalnih pogojev za ločevanje faz tla/raztopina pomembno upoštevati morebiten obstoj tretje „psevdofaze“ – koloidov. Ti delci, manjši od 0,2 μm, lahko pomembno vplivajo na celoten mehanizem adsorpcije snovi v suspenziji tal. Kadar se centrifugiranje izvaja po zgornjem opisu, koloidi ostanejo v vodni fazi in se analizirajo skupaj z vodno fazo. Tako se informacije o njihovem vplivu izgubijo.

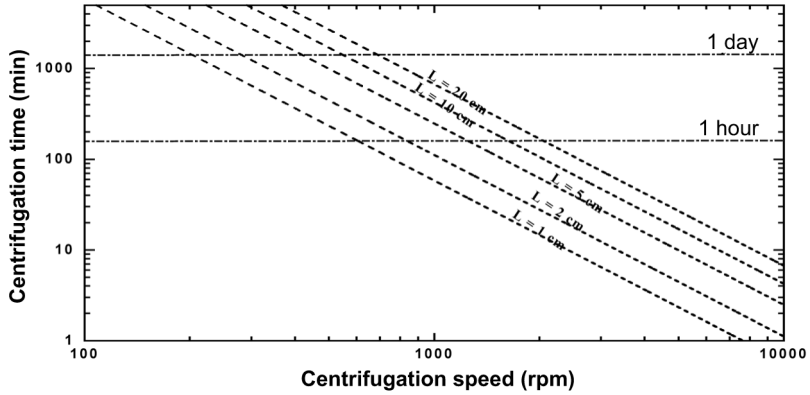
   Če ima zadevni laboratorij možnost ultracentrifugiranja ali ultrafiltracije, je mogoče adsorpcijo/desorpcijo snovi v tleh proučiti bolj podrobno ter tako pridobiti tudi informacije o adsorpciji snovi na koloide. V tem primeru se izvede ultracentrifugiranje pri 60 000 rpm/min ali ultrafiltracija s poroznostjo filtra 100 000 Daltonov za ločitev treh faz – tal, koloidov in raztopine. Tudi preskusni protokol se ustrezno prilagodi, da bodo vse tri faze analizirane.

Slika 1a



Spreminjanje časa centrifugiranja (t) v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja (rpm) za različne gostote tal (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$ and ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} at 25 °C.

Slika 1b.



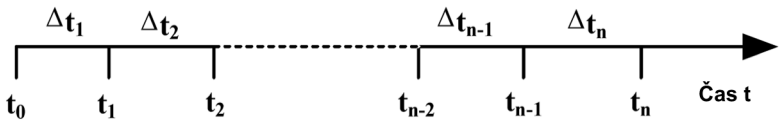
Spreminjanje časa centrifugiranja (t) v odvisnosti od hitrosti centrifugiranja (rpm) za različne dolžine zmesi v centrifugirki (Rb -Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 x 10-^{3}g $s^{-1}cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} pri 25 °C in ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

DODATEK 5

IZRAČUN ADSORPCIJE A (%) IN DESORPCIJE D (%)

Časovna shema postopka je:



Pri vseh izračunih se predpostavlja, da je preskusna snov stabilna in da se bistveno ne adsorbira na stene posode.

ADSORPCIJA A (A %)

(a) *Paralelna metoda*

Odstotek adsorpcije se izračuna za vsako epruveto (i) za vsak čas (t_i) po enačbi:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Elementi te enačbe se lahko izračunajo na naslednji način:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

pri čemer je:

A_{ti} = odstotek adsorpcije (%) ob času t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa preskusne snovi na tleh ob času t_i, ko se opravi analiza (μg);

m_0 = masa preskusne snovi v epruveti na začetku preskusa (μg);

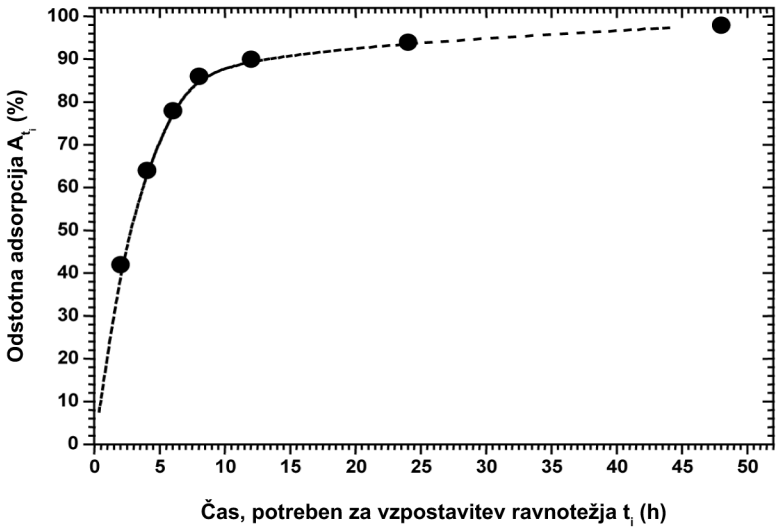
C_0 = začetna masna koncentracija preskusne raztopine v stiku s tlemi (μg cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = masna koncentracija snovi v vodni fazi ob času t_i, ko se izvaja analiza (μg cm^{-3}); ta koncentracija se določi analitsko ob upoštevanju vrednosti, dobljenih s slepimi vzorci.

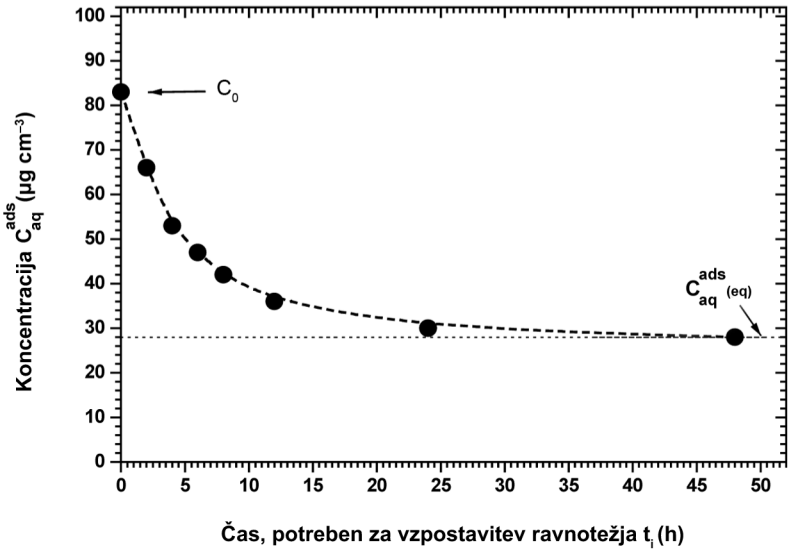
V_0 = začetna prostornina preskusne raztopine v stiku s tlemi (cm^3).

Vrednosti odstotka adsorpcije A_{t_i} ali $C_{aq}^{ads}(t_i)$ se prikažejo grafično v odvisnosti od časa in določi se čas, potreben za vzpostavitev sorpcijskega ravnotežja. Primera takih grafov sta sliki 1 in 2.



Slika 1

Graf adsorpcijskega ravnotežja



Slika 2

Masna koncentracija preskusne snovi v vodni fazi (C_{aq}) v odvisnosti od časa

▼B

(b) *Serialna metoda*

Naslednje enačbe upoštevajo, da se adsorpcij ski postopek izvaja z merjenjem preskusne snovi v majhnih alikvotnih delih vodne faze v točno določenih časovnih intervalih.

— Za vsak časovni interval se količina snovi, adsorbirane na tla, izračuna po naslednjih enačbah:

— za prvi časovni interval $\Delta t_i = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— za drugi časovni interval $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— za tretji časovni interval $\Delta t3 = t3 - t2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— za n-ti časovni interval $\Delta tn = tn - tn - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Odstotek adsorpcije za vsak časovni interval, $A_{\Delta t_i}$, se izračuna po naslednji enačbi:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

odstotek adsorpcije A_{t_i} ob času t_i pa se izračuna po enačbi:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Vrednosti adsorpcije A_{t_i} ali $A_{\Delta t_i}$ (glede na potrebe študije) se prikažejo grafično v odvisnosti od časa in določi se čas, potreben za vzpostavitev sorpcijskega ravnotežja.

— Ob času uravnoteženja t_{eq}:

— je masa preskusne snovi, adsorbirane na tla:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_{i=1}}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— je masa preskusne snovi v raztopini:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— odstotek adsorpcije ob ravnotežju pa je:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Zgoraj uporabljeni parametri so:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa snovi, adsorbirane na tla v časovnih intervalih Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} (μg);

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = masa snovi, izmerjena v alikvotu $v_a{}^A$ ob časih t_1, t_2, t_n (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = masa snovi, adsorbirane na tla ob adsorpcijskem ravnotežju (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa snovi v raztopini ob adsorpcijskem ravnotežju (μg);

$v_a{}^A$ = prostornina alikvota, v katerem se meri preskusna snov (cm^3);

$A_{\Delta ti}$ = odstotek adsorpcije, ki ustreza časovnemu intervalu Δt_i (%);

A_{eq} = odstotek adsorpcije ob adsorpcijskem ravnotežju (%).

DESORPCIJA D (%)

Za čas t_0, ko se začne poskus kinetike desorpcije, velja trenutek, ko se največja rekuperirana prostornina raztopine preskusne snovi (potem, ko je adsorpcijsko ravnotežje vzpostavljeno) nadomesti z enako prostornino 0,01 M raztopine $CaCl_2$.

(a) *Paralelna metoda*

Ob času t_i se masa preskusne snovi izmeri v vodni fazi, vzeti iz epruvete i (V_r^i), desorbirana masa pa se izračuna po enačbi:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Ob desorpcijskem ravnotežju je $t_i = t_{eq}$ in zato je $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Masa preskusne snovi, desorbirane v nekem časovnem intervalu (Δt_i) se izračuna po enačbi:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Odstotek desorpcije se izračuna:

b času t_i po enačbi:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

in za časovni interval (Δt_i) po enačbi:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

pri čemer je:

D_{ti} = odstotek desorpcije ob času t_i (%);

$D_{\Delta ti}$ = odstotek desorpcije, ki ustreza časovnemu intervalu Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masa preskusne snovi, desorbirane ob času t_i, (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masa preskusne snovi, desorbirane v časovnem intervalu Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = masa preskusne snovi, analitsko izmerjena ob času t_i v prostornini raztopine V_r^i, odvzeti za analizo (μg);

$m_{aq}{}^{A}$ = masa preskusne snovi, ki ostane od adsorpcijskega ravnotežja zaradi nepopolne nadomestitve prostornine (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa preskusne snovi v raztopini ob adsorpcijskem ravnotežju (μg);

V_R = prostornina supernatanta, odstranjenega iz epruvete po vzpostavitvi adsorpcijskega ravnotežja in nadomeščenega z enako prostornino 0,01 M raztopine $CaCl_2$ (cm^3);

V_r^i = prostornina raztopine, vzete iz epruvete (i) za meritev preskusne snovi pri poskusu kinetike desorpcije (cm^3).

Vrednosti desorpcije D_{ti} ali $D_{\Delta ti}$ (glede na potrebe študije) se prikažejo grafično v odvisnosti od časa in določi se čas, potreben za vzpostavitev desorpcijskega ravnotežja.

b) *Serialna metoda*

Naslednje enačbe upoštevajo, da je bil predhodni adsorpcijski postopek izveden z merjenjem preskusne snovi v majhnih alikvotnih delih (v_a^A) vodne faze (serijska metoda pod 1.9 „Izvedba preskusa“). Predpostavlja se: (a) da je bila prostornina supernatanta, odstranjenega iz epruvete po preskusu kinetike adsorpcije, nadomeščena z enako prostornino 0,01 M raztopine $CaCl_2$ (V_R) in (b) da skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi (V_T) med poskusom kinetike desorpcije ostane konstantna in se izračuna po enačbi:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Ob času t_i:

— se masa preskusne snovi izmeri v majhnem alikvotnem delu (v_a^D), desorbirana masa pa se izračuna po enačbi:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Ob desorpcijskem ravnotežju je $t_i = t_{eq}$ in zato je $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Odstotek desorpcije D_{t_i} se izračuna po naslednji enačbi:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Ob časovnem intervalu (Δt_i):

Za vsak časovni interval se količina desorbirane snovi izračuna:

— za prvi časovni interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— za drugi časovni interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and (22)

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— za n-ti časovni interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and (23)

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Nazadnje se izračuna odstotek desorpcije za vsak časovni interval $D_{\Delta t_i}$ po naslednji enačbi:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

odstotek desorpcije D_{t_i} ob času t_i pa se izračuna po enačbi:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

pri čemer so zgoraj uporabljeni parametri:

$m^{des}{}_s(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_s(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_s(\Delta t_n)$ = masa snovi, ki ostane adsorbirana v tleh po časovnih intervalih Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg);

$m^{des}{}_{aq}(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_n)$ = masa preskusne snovi, desorbirane v časovnih intervalih Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg);

$m^{des}{}_m(t_1)$, $m^{des}{}_m(t_2)$,... , $m^{des}{}_m(t_n)$ = masa snovi, izmerjene v alikvotu (v_a^D) ob časih t_1, t_2,..., t_n, (μg);

V_T = skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi med poskusom kinetike desorpcije, izvedenem s serijsko metodo (cm^3);

m_{aq}^A = masa snovi, ki ostane od adsorpcijskega ravnotežja zaradi nepopolne nadomestitve prostornine (μg);

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq)$$

V_R = prostornina supernatanta, odstranjenega iz epruvete po vzpostavitvi adsorpcijskega ravnotežja in nadomeščenega z enako prostornino 0,01 M raztopine $CaCl_2$ (cm^3);

v_a^D = prostornina alikvota, odvzetega iz epruvete (i) za namen analize med poskusom kinetke desorpcije, izvedenim s serijsko metodo (cm^3);

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

DODATEK 6

ADSORPCIJA/DESORPCIJA V TLEH: LISTI ZA POROČANJE PODATKOV

Preskušana snov:

Preskušan tip tal:

Vsebnost suhe mase v tleh (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Primernost analitske metode

Teža tal	g	
Tla: suha masa	g	
Prostornina raztopine $CaCl_2$	cm^3	
Nominalna koncentracija končne razopine	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analitska koncentracija končne razopine	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princip uporabljene analitske metode:

Umerjanje analitske metode:

Preskušana snov:

Preskušan tip tal:

Vsebnost suhe mase v tleh (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Uporabljena analitska metodologija: Posredna ☐ Paralelna ☐ Serialna ☐

Neposredna ☐

Preskus adsorpcije: preskusni vzorci

	Simbol	Enota	Čas uravnoteženja		Čas uravnoteženja		Čas uravnoteženja		Čas uravnotežen	
Št. epruvete										
Masa tal	—	g								
Tla: suha masa	m_{soil}	g								
Prostornina vode v zatehtanih tleh (izračunana)	V_{WS}	cm^3								
Prostornina 0,01 M raztopine $CaCl_2$ za vzpostavitev ravnotežja v tleh		cm^3								
Prostornina osnovne raztopine		cm^3								
Skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi	V_0	cm^3								
Začetna koncentracija preskusne raztopine	C_0	$\mu g cm^{-3}$								
Masa preskusne snovi na začetku preskusa	m_0	µg								

▼B

	Simbol	Enota	Čas uravnoteženja		Čas uravnoteženja		Čas uravnoteženja		Čas uravnotežen	
Po stresanju in centrifugiranju										
NEPOSREDNA METODA										
Paralelna metoda										
Koncentracija preskusne snovi v vodni fazi, vključno s korekcijo za vrednost slepega vzorca	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Serialna metoda										
Masa preskusne snovi, izmerjena v alikvotu V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
NEPOSREDNA METODA										
Masa preskusne snovi adsorbirane v tleh	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Izračun adsorpcije										
Adsorpcija	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Srednje velikosti										
Adsorpcijski koeficient	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Srednje velikosti										
Adsorpcijski koeficient	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Srednje velikosti										

Preskušana snov:

Preskušan tip tal:

Vsebnost suhe mase v tleh (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Preskus adsorpcije: slepi vzorci in kontrola

	Simb ol	Enota	Slepi vzorec		Slepi vzorec		Kontrola	
Št. epruvete								
Masa tal		g					0	0
Prostornina vode v zatehtanih tleh (izračunana)		cm^3					—	—
Prostornina 0,01 M raztopine $CaCl_2$ za vzpostavitev ravnotežja v tleh		cm^3						
Prostornina osnovne raztopine		cm^3	0	0				
Skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi		cm^3					—	—

▼B

	Simb ol	Enota	Slepi vzorec		Slepi vzorec		Kontrola	
Začetna koncentracija preskusne snovi v vodni fazi		µg cm^{-3}						
Po stresanju in centrifugiranju								
Koncentracija v vodni fazi		µg cm^{-3}						

Opomba: Po potrebi dodajte stolpce

Preskušana snov:

Preskušan tip tal:

V sebnost suhe mase v tleh (105 °C 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Masna bilanca

	Simbol	Enota				
Št. epruvete						
Masa tal	—	g				
Tla: suha masa	ms_{oil}	g				
Prostornina vode v zatehtanih tleh (izračunana)	V_{WS}	ml				
Prostornina 0,01 M raztopine $CaCl_2$ za vzpostavitev ravnotežja v tleh		ml				
Prostornina osnovne raztopine		cm^3				
Skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi	V_0	cm^3				
Začetna koncentracija preskusne raztopine	C_0	µg cm^{-3}				
Čas potreben za vzpostavitev ravnotežja	—	h				
Po stresanju in centrifugiranju						
Koncentracija preskusne snovi v vodni fazi ob adsorpcijskem ravnotežju, vključno s korekcijo za vrednost slepega vzorca	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Čas uravnoteženja	t_{eq}	h				
Prvo redčenje s topilom						
Odstranjena prostornina vodne faze	V_{rec}	cm^3				
Dodana prostornina topila	ΔV	cm^3				
Prva ekstrakcija s topilom						
Signal, analiziran v topilu	S_{E1}	var.				
Koncentracija preskusne snovi v topilu	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Simbol	Enota				
Masa snovi, ekstrahirane iz tal in sten posode	m_{E1}	µg				
Drugo redčenje s topilom						
Odstranjena prostornina topila	$_V_s$	cm^3				
Dodana prostornina topila	V	cm^3				
Druga ekstrakcija s topilom						
Signal, analiziran v fazi topila	S_{E2}	var.				
Koncentracija preskusne snovi v topilu	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masa snovi, ekstrahirane iz tal in sten posode	m_{E2}	µg				
Skupna masa preskusne snovi, ekstrahirana v dveh kroakih	m_E	µg				
Masna bilanca	MB	%				

Preskušana snov:

Preskušan tip tal:

Vsebnost suhe mase v tleh (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Adsorpcijske izoterme

	Simbol	Enota								
Št. epruvete										
Masa tal	—	g								
Tla: suha masa	E	g								
Prostornina vode v zatehtanih tleh (izračunana)	V_{WS}	cm^3								
Prostornina 0,01 M raztopine $CaCl_2$ za vzpostavitev ravnotežja vtleh		cm^3								
Prostornina dodane osnovne raztopine		cm^3								
Skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi (izračunana)	V_0	cm^3								
Koncentracija raztopine	C_0	µg cm^{-3}								
Čas potreben za vzpostavitev ravnotežja	—	h								

▼B

	Simbol	Enota								
Po stresanju in centrifugiranju										
Koncentracija snovi v vodni fazi, vkljulno s korekcijo za vrednost slepega vzorca	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Adsorbirana masa na enoto tal	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regresijska analiza:

vrednost K^{ads}_{F}:

vrednost l/n:

regresijski koeficient r^2:

Preskušana snov:

Preskušan tip tal:

Vsebnost suhe mase v tleh (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Uporabljena metodologija: analitska ☐ Paralelna ☐ Serialna ☐
Posredna

Preskus desorpcije

		Simbol	Enota	Časovni interval	Časovni interval	Časovni interval	Časovni interval
Št. epruvete iz faze adsorpcije							
Masa snovi, adsorbirane na tla v adsorpcijskem ravnotežju		$m_{s}^{ads}(eq)$	µg				
Odstranjena prostornina vodne faze, nadomeščena z 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Skupna prostornina vodne faze v stiku s tlemi	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Masa preskusne snovi, ki ostane od adsorpcijskega ravnotežja zaradi nepopolne nadomestitve prostornine		m_{aq}^{A}	µg				
Kinetika desorpcije							
Izmerjena masa snovi, desorbirane s tal ob času t_i		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Prostornina raztopine, vzete iz epruvete (i) za meritev preskusne snovi	PM	V^{i}_{r}	cm^3				
	SM	v^{D}_{a}	cm^3				
Masa snovi, desorbirane s tal ob času t_i (izračunana)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masa snovi, desorbirane s tal v časovnem intervalu Δt_i (izračunana)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Simbol	Enota	Časovni interval	Časovni interval	Časovni interval	Časovni interval
Odstotek desorpcije						
Desorpcija ob časut_i	D_{ti} %	%				
Desorpcija v časovnem intervalu Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Desorpcijski koeficient	K_{des}					

PM: Paralelna metoda

SM: Serialna metoda

▼B

C.19 OCENJEVANJE ADSORPCIJSKEGA KOEFICIENTA (K_{OC}) TAL IN ODPADNEGA BLATA (BLATA IZ ČISTILNIH NAPRAV) S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG121 (2001).

1.1 UVOD

Sorptivno obnašanje snovi v tleh ali odpadnem blatu iz čistilnih naprav lahko opišemo s parametri, ki se eksperimentalno ugotovijo s preskusno metodo C.18. Eden od pomembnih parametrov je adsorpcijski koeficient, ki je opredeljen kot razmerje med koncentracijo snovi v tleh/blatu in koncentracijo snovi v vodni fazi ob adsorpcijskem ravnotežju. Adsorpcijski koeficient, normiran na vsebnost organskega ogljika v tleh (K_{oc}), je koristen pokazatelj sposobnosti vezave kemikalije na organske snovi v tleh in odpadnem blatu ter omogoča primerjavo med različnimi kemikalijami. Ta parameter je mogoče oceniti prek korelacije s topnostjo v vodi in porazdelitvenim koeficientom n-oktanol/voda (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Eksperimentalna metoda, opisana v tem preskusu, uporablja HPLC za ocenitev adsorpcijskega koeficienta K_{oc} v tleh in odpadnem blatu (8). Dobljene vrednosti so bolj zanesljive kot tiste, izračunane z metodo QSAR (9). Kot ocenjevalna metoda ne more popolnoma nadomestiti šaržnih preskusov ravnotežja, ki se uporabljajo v preskusni metodi C.18. Kljub temu je lahko ocenjeni K_{oc} koristen pri izbiranju ustreznih preskusnih parametrov za proučevanje adsorpcije/desorpcije po preskusni metodi C.18 z računanjem K_d (porazdelitveni koeficient) ali K_f (Freundlichov adsorpcijski koeficient) po enačbi 3 (glej poglavje 1.2).

1.2 OPREDELITEV POJMOV

K_d: Porazdelitveni koeficient je opredeljen kot razmerje med ravnotežnimi koncentracijami C raztopljene preskusne snovi v dvofaznem sistemu iz sorbenta (tla ali odpadno blato) in vodne faze; to je vrednost brez enote, kadar sta koncentraciji v obeh fazah izraženi kot teža/težo. Če je koncentracija v vodni fazi podana kot teža/prostornino, je enota ml· g^{-1}. K_d se lahko spreminja glede na sorptivne lastnosti in je lahko odvisen od koncentracije.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

pri čemer je:

C_{soil} = koncentracija preskusne snovi v tleh ob ravnotežju (µg· g^{-1})

C_{sludge} = koncentracija preskusne snovi v blatu ob ravnotežju (µg· g^{-1})

C_{aq} = koncentracija preskusne snovi v vodni fazi ob ravnotežju (µg· g^{-1}, µg· ml^{-1}).

▼B

K_f: Freundlichov adsorpcijski koeficient je opredeljen kot koncentracija preskusne snovi v tleh ali odpadnem blatu (x/m), ko je ravnotežna koncentracija C_{aq} v vodni fazi enaka ena; enota je μg· g^{-1} sorbenta. Vrednost se lahko spreminja glede na sorptivne lastnosti.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

pri čemer je:

x/m = količina preskusne snovi x (μg), adsorbirane na količino sorbenta m (g) ob ravnotežju

1/n = nagib Freundlichove adsorpcijske izoterme

C_{aq} = koncentracija preskusne snovi v vodni fazi ob ravnotežju (μg· ml^{-1})

$$\text{At} C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Porazdelitveni koeficient (K_d) ali Freundlichov adsorpcijski koeficient (K_f), normiran na vsebnost organskega ogljika (f_{oc}) v sorbentu; zlasti za neionizirane kemikalije je približni pokazatelj obsega adsorpcije med snovjo in sorbentom in omogoča primerjavo med različnimi kemikalijami. Glede na enote K_d in K_f je K_{oc} lahko brez enote ali ima enoto ml· g^{-1} ali μg· g^{-1} organske snovi.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}} \text{(dimensionless or ml} \cdot g^{-1}) \text{ or } \frac{\text{Kf}}{\text{foc}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Razmerje med K_{oc} in K_d ni vedno linearno, tako da so lahko vrednosti K_{oc} različne pri različnih tipih tal, vendar je njihova variabilnost močno zmanjšana v primerjavi z vrednostmi K_d ali K_f .

Adsorpcijski koeficient (K_{oc}) se izpelje iz kapacitivnega faktorja (k') s pomočjo umeritvenega grafa log k' v odvisnosti od log K_{oc} izbranih referenčnih spojin.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

pri čemer je:

t_R = retencijski čas preskusne in referenčne snovi pri HPLC (minute)

t_0 = mrtvi čas pri HPLC (minute) (glej poglavje 1.8.2).

P_{OW}: Porazdelitveni koeficient oktanol/voda je opredeljen kot razmerje med koncentracijama raztopljene snovi v n-oktanolu in vodi; to je vrednost brez enote.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coctanol}}{\text{Caq}} (= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3 REFERENČNE SNOVI

Pred uporabo metode naj bodo znane strukturna formula, čistost In disociacijska konstanta (če je ustrezno). Koristne so informacije o topnosti v vodi in organskih topilih, porazdelitvenem koeficientu oktanol/voda in hidroliznih lastnostih.

▼B

Za korelacijo izmerjenih podatkov o retenciji pri FIPLC za preskusno snov z njenim adsorpcijskim koeficientom K_{oc} je treba izdelati umeritveni graf log K_{oc} v odvisnosti od k'. Uporabiti je treba vsaj šest referenčnih točk, pri čemer je vsaj ena nad in ena pod pričakovano vrednostjo za preskusno snov. Točnost metode se znatno izboljša, če se uporabijo referenčne snovi, ki so strukturno sorodne preskusni snovi. Če t_i podatki niso na razpolago, uporabnik sam izbere ustrezne umeritvene snovi. V tem primeru se izbere bolj splošna skupina strukturno heterogenih snovi. Snovi in vrednosti K_{oc}, ki se lahko uporabijo, so naštete v Dodatku in sicer v tabeli 1 za odpadno blato in v tabeli 3 za tla. Izbira drugih umeritvenih snovi mora biti utemeljena.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

HPLC se izvaja s analiznimi kolonami, polnjenimi s cianopropilno trdno fazo (cianopropilnimi trdnimi delci), ki je na voljo na tržišču in ki vsebuje lipofilne in polarne dele. Uporablja se zmerno polarna stacionarna faza na osnovi matrice iz silicijevega oksida:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silicijev oksid	nepolarni vmesnik	polami del

Princip preskusne metode je podoben kot pri preskusni metodi A.8 (porazdelitveni koeficient, metoda HPLC). Pri potovanju skozi kolono skupaj z mobilno fazo pride do interakcije med preskusno snovjo in stacionarno fazo. Porazdeljevanje med mobilno in stacionarno fazo zadrži preskusno snov. Dvojna sestava stacionarne faze, ki ima polarna in nepolarna mesta, omogoča interakcijo med polarnimi in nepolarnimi skupinami molekule na podoben način kot pri organskih snoveh v matriksu tal ali odpadnega blata. To omogoča določitev odnosa med retencijskim časom v koloni in adsorpcijskim koeficientom na organski snovi.

pH ima pomemben vpliv na obnašanje pri sorpcij zlasti pri polarnih snoveh. Pri kmetijskih tleh in v bazenih komunalnih čistilnih naprav je pH navadno med 5,5 in 7,5. Za snovi, ki lahko ionizirajo, je treba izvesti dva preskusa, za ionizirano in neionizirano obliko, v ustreznih pufrih, vendar samo če najmanj 10 % preskusne spojine disociira v območju pH 5,5 do 7,5.

Ker se pri ocenjevanju uporabi samo razmerje med retencijo na koloni HPLC in adsorpcijskim koeficientom, kvantitativna analitska metoda ni potrebna, potrebna je samo določitev retencijskega časa. Če je na voljo primerna skupina referenčnih snovi in se lahko uporabijo standardni eksperimentalni pogoji, ta metoda predstavlja hiter in učinkovit način ocenjevanja adsorpcijskega koeficienta K_{oc}.

1.5 UPORABNOST PRESKUSA

Metoda HPLC je uporabna za kemične snovi (označene ali neoznačene), za katere je na razpolago ustrezen sistem za detekcijo (npr. spektrofotometer, detektor radioaktivnosti) in ki so v času trajanja poskusa dovolj stabilne. Zlasti koristna je lahko za kemikalije, ki jih je z drugimi eksperimentalnimi sistemi težko proučevati (t.j. hlapne snovi; snovi, ki v vodi niso topne pri koncentraciji, ki jo je mogoče analitsko izmeriti; snovi z visoko afiniteto do površine inkubacijskih sistemov). Metoda se lahko uporabi za zmesi, pri katerih ostanejo neločljivi elucijski trakovi. V tem primeru je treba navesti zgornje in spodnje mejne vrednosti log K_{oc} spojin preskusne zmesi.

▼B

Nečistote lahko včasih povzročijo težave pri razlagi rezultatov HPLC, vendar so majhnega pomena, če je mogoče preskusno snov analitsko jasno določiti in ločiti od nečistot.

Metoda je validirana za snovi iz tabele 1 v Dodatku in je bila uporabljena tudi za razne druge kemikalije iz naslednjih razredov:

— aromatski amini (npr. trifluralin, 4-kloroanilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, N-metilanilin, 1-naftilamin),

— aromatski estri karboksilne kisline (npr. metilester benzojske kisline, etilester 3,5-dinitrobenzojske kisline),

— aromatski ogljikovodiki (npr. toluen, ksilen, etilbenzen, nitrobenzen),

— estri ariloksifenoksipropionske kisline (npr. diklofop-metil, fenoksaprop-etil, fenoksaprop-P-etil),

— benzimidazolijevi in imidazolijevi fungi cidi (npr. karbendazim, fuberidazol, triazokside),

— amidi karboksilne kisline (npr. 2-klorobenzamid, N,N-dimetilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— klorirani ogljikovodiki (npr. endosulfan, DDT, heksaklorobenzen, kvintozen, 1,2,3-triklorobenzen),

— organofosforjevi insekticidi (npr. azinfos-metil, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos),

— fenoli (npr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklorofenol, 2,4,6-triklorofenol, 1-naftol),

— derivati feniluree (npr. izoproturon, monolinuron, pencikuron),

— pigmentna barvila (npr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— poliaromatski ogljikovodiki (npr. acenaften, naftalen),

— 1,3,5-triazin herbicidi (npr. prometrin, propazin, simazin, terbutrin),

— derivati triazola (npr. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoda ni uporabna za snovi, ki reagirajo bodisi z eluentom ali stacionarno fazo. Prav tako ni uporabna za snovi, ki na specifičen način interagirajo z anorganskimi komponentami (npr. tvorba gručastih kompleksov z minerali gline). Metoda morda ne bo delovala pri površinsko aktivnih snoveh, anorganskih spojinah in zmernih ali močnih organskih kislinah ali bazah. Določiti je mogoče vrednosti log K_{oc} v razponu od 1,5 to 5,0. Snovi, ki lahko ionizirajo, je treba meriti s pomočjo pufrske mobilne faze, vendar je treba paziti, da se prepreči obarjanje pufrskih komponent ali preskusne snovi.

▼B

1.6 MERILA KAKOVOSTI

1.6.1 **Točnost**

Navadno je adsorpcijski koeficient preskusne snovi mogoče oceniti do ± 0,5 logaritemske enote vrednosti, določene z metodo šaržnih preskusov ravnotežja (glej tabelo 1 v Dodatku). Boljša točnost se lahko doseže, če so referenčne snovi strukturno sorodne preskusni snovi.

1.6.2 **Ponovljivost**

Določanje je treba izvesti vsaj v dveh ponovitvah. Vrednosti log K_{oc} dobljene pri posameznih merjenjih naj bodo znotraj obsega 0,25 logaritemske enote.

1.6.3 **Obnovljivost**

Dosedanje izkušnje z uporabo te metode potrjujejo njeno veljavnost. Pri preiskavi metode HPLC s pomočjo 48 snovi (večinoma pesticidov), za katere so bili na razpolago zanesljivi podatki o K_{oc} tal, je bil ugotovljen korekcijski koeficient R = 0,95 (10) (11).

Za izboljšanje in validacijo metode je bil izveden preskus s primerjavo med laboratoriji, v katerem je sodelovalo 11 laboratorijev (12). Izsledki so navedeni v tabeli 2 v Dodatku.

1.7 OPIS PRESKUSNE METODE

1.7.1 **Predhodna ocenitev adsorpcijskega koeficienta**

Porazdelitveni koeficient oktanol/voda P_{ow} (= K_{ow}) in, do neke mere, topnost v vodi se lahko uporabita kot pokazatelja obsega adsorpcije, zlasti za neionizirane snovi, in se tako lahko uporabita za predhodno določanje območja. Objavljena je bila že vrsta koristnih korelacij za več skupin kemikalij (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2 **Naprave**

Potreben je tekočinski kromatograf, opremljen s črpalko brez pulzov in primernim detektorjem. Priporočljiva je uporaba injekcijskega ventila z injekcijsko zanko. Uporabi se komercialni cianopropil vezan na silikagel (npr. Hypersil in Zorbax CN). Med injekcijski sistem in analizno kolono se lahko namesti varovalna kolona iz enakega materiala. Kolone različnih dobaviteljev se lahko znatno razlikujejo glede na učinkovitost ločevanja. Kot vodilo je treba doseči naslednje faktorje zmogljivosti k': log k' > 0,0 za log K_{oc} = 3,0 in log k' > – 0,4 za log K_{oc} = 2,0 pri uporabi mobilne faze metanol/voda 55/45 %.

1.7.3 **Mobilne faze**

Preskušenih je bilo več mobilnih faz, priporočljivi pa sta naslednji dve:

— metanol/voda (55/45 % v/v)

— metanol/0,01 M citratni pufer pH 6,0 (55/45 % V/V)

▼B

Metanol čistosti za HPLC in destilirana voda ali citratni pufer se uporabita za pripravo elucijskega topila. Zmes se pred uporabo razplini. Uporabiti je treba izokratsko elucijo. Če zmes metanol/voda ni ustrezna, se lahko poskusi z drugimi zmesmi organskih topil in vode, npr. etanol/voda ali acetonitril/voda. Pri spojinah, ki lahko ionizirajo, je priporočljiva uporaba pufra za stabilizacijo pH. Poskrbeti je treba, da ne pride do obarjanja soli in uničenja kolone, kar se lahko zgodi pri nekaterih zmeseh: organska faza/pufer.

Ne smejo se uporabljati dodatki, kot so reagenti z ionskim parom, ker lahko vplivajo na sorptivne lastnosti stacionarne faze. Take spremembe stacionarne faze so lahko ireverzibilne. Zaradi tega je treba poskuse z dodatki obvezno izvajati na ločenih kolonah.

1.7.4 **Topljenci**

Preskusne in referenčne snovi je treba raztopiti v mobilni fazi.

1.8 IZVEDBA PRESKUSA

1.8.1 **Preskusni pogoji**

Treba je beležiti temperaturo med meritvami. Uporaba termostatirane peči s kromatografsko kolono je zelo priporočljiva za zagotavljanje konstantnih pogojev med umerjanjem in ocenjevanjem ter merjenjem preskusne snovi.

1.8.2 **Določanje mrtvega časa t_0**

Za določanje mrtvega časa t_0 se lahko uporabita dve različni metodi (glej tudi poglavje 1.2).

1.8.2.1 *Določanje mrtvega časa to s pomočjo homologne serije*

Ta postopek dokazano daje zanesljive in standardizirane vrednosti t_0. Za podrobnosti glej preskusno metodo A.8: porazdelitveni koeficient (n-oktanol/voda), metoda HPLC.

1.8.2.2 *Določanje mrtvega časa to s pomočjo inertnih snovi, ki jih kolona ne zadrži*

Ta tehnika temelji na injiciranju raztopin formamida, sečnine ali natrijevega nitrata. Meritve je treba opraviti vsaj v dveh ponovitvah.

1.8.3 **Določanje retencijskega časa t_R**

Referenčne snovi se izberejo kakor je opisano v poglavju 1.3. Lahko se injicirajo kot mešani standard za določitev njihovih retencijskih časov, pod pogojem da je bilo potrjeno, da prisotnost drugih referenčnih standardov ne vpliva na retencijski čas posameznega referenčnega standarda. Umerjanje se opravlja v rednih presledkih vsaj dvakrat dnevno, da se lahko upoštevajo nepričakovane spremembe v delovanju kolone. Najbolje je umeritveno injiciranje izvesti pred in po injiciranju preskusne snovi za potrditev, da se retencijski časi niso spremenili. Preskusne snovi se injicirajo ločeno v čim manjših količinah (da ne bi prišlo do preobremenitve kolone) in določijo se njihovi retencijski časi.

▼B

Za večjo zanesljivost meritev je treba določitev opraviti vsaj dvakrat. Vrednosti log K_{oc} v posameznih meritvah morajo biti v območju 0,25 logaritemske enote.

1.8.4 **Vrednotenje**

Kapacitivni faktorji k' se izračunajo iz mrtvega časa t_0 in retencijskih časov t_R izbranih referenčnih snovi po enačbi 4 (glej poglavje 1.2). Podatke log k' za referenčne snovi se nato vnese v graf odvisnosti od njihovih vrednosti K_{oc} iz poskusov s šaržnim ravnotežjem iz tabel 1 in 3 v Dodatku. S pomočjo tega grafičnega prikaza se nato vrednost log k' preskusne snovi uporabi za določitev njene vrednosti log K_{oc}. Če dejanski rezultati pokažejo, da je log K_{oc} preskusne snovi izven umeritvenega območja, je treba preskus ponoviti in uporabiti druge, bolj ustrezne referenčne snovi.

2. **PODATKI IN POROČANJE**

Poročilo mora vsebovati naslednje informacije:

— identiteto preskusnih in referenčnih snovi in njihovo čistost ter vrednosti pK_a, če je ustrezno,

— opis opreme in delovnih pogojev, npr. vrsta in dimenzije analizne (in varovalne) kolone, detekcijsko sredstvo, mobilna faza (razmerje komponent in pH), temperaturni razpon med meritvami,

— mrtvi čas in metodo za njegovo določanje,

— količine preskusnih in referenčnih snovi v koloni,

— retencijske čase referenčnih spojin, uporabljenih za umerjanje,

— podrobnosti o prilagojeni regresijski premici (log k' v odvisnosti od log K_{oc}) in graf regresijske premice,

— podatke o povprečni retenciji in ocenjeno vrednost log K_{oc} za preskusno spojino,

— kromatograme.

3. **LITERATURA**

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227–231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297–312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831–832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833–846.

(8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2). 121–128.

(9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

(10) W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12). 2341–2352.

(11) B. von Oepen, W. Kordel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285–304.

(12) W. Kordel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373–1384.

▼B

DODATEK

Tabela 1

Primerjava vrednosti K_{oc} za tla in blato iz čistilnih naprav ter vrednosti, izračunane po presejalni metodi HPLC ([1]), ([2])

Snov	Št. CAS	log K_{oc} za odpadno blato	log K_{oc} pri HPLC	Δ	log K_{oc} za tla	log K_{oc} pri HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Fenil benzoat	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dikloroanilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2). 121–128.
([2]) W. Kordel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107–119.

Tabela 2

Izsledki preskusa s primerjavo med laboratoriji (11 sodelujočih laboratorijev), izvedenega za izboljšanje in validacijo metode HPLC ([1])

Snov	Št. CAS	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[metoda HPLC]	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 + 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 + 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 + 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 + 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 + 648	3,31

([1]) W. Kordel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373–1384

▼B

Tabela 3

Priporočene referenčne snovi za presejalno metodo HPLC na osnovi adsorpcijskih podatkov za tla

Referenčna snov	Št. CAS	Povprečne vrednosti log K_{oc} iz šaržnega preskusa ravnotežja	Število podatkov K_{oc}	log S.D.	Vir
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N.N-dimetilbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Metilbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metil benzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3 -Nitrob enzami d	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazim	10605-21- 7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoksid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfandiol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3 -Triklorobenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
y-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-metil	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantrene	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (zmes)	26850-47- 5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kordel, J. Miiller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R&D Report No. 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kordel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285–304
[c] Podatki iz industrije

▼M7

C.20 PRESKUS RAZMNOŽEVANJA VRSTE *DAPHNIA MAGNA*

UVOD

Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 211 (2012). Preskusne smernice OECD se ob upoštevanju znanstvenega napredka redno pregledujejo. Smernica za preskušanje razmnoževanja 211 temelji na smernici za preskušanje 202, Del II, Preskus razmnoževanja vrste *Daphnia* sp. (1984). Na splošno je bilo ugotovljeno, da so lahko podatki iz preskusov, izvedenih v skladu s to smernico za preskušanje 202, spremenljivi. Zaradi tega so bila precejšnja prizadevanja namenjena temu, da bi se opredelili razlogi za to spremenljivost in da bi se oblikovala boljša preskusna metoda. Smernica za preskušanje 211 temelji na rezultatih teh raziskovalnih dejavnosti, krožnih preskusov in validacijskih študij, izvedenih v letih 1992 (1), 1994 (2) in 2008 (3).

Glavne razlike med prvo (TG 202, 1984) in drugo različico (TG 211, 1998) smernice za preskušanje razmnoževanja so:

— za uporabo je priporočena vrsta vodnih bolh *Daphnia magna*;

— preskus traja 21 dni;

— pri polstatičnih preskusih se je število živali, ki jih je treba uporabiti za vsako preskusno koncentracijo, zmanjšalo s vsaj 40, ki se po možnosti razdelijo v štiri skupine po deset živali, na vsaj deset živali, ki se gojijo ločeno (čeprav se lahko za pretočne preskuse uporabijo drugačni načrti);

— za preskusni medij in pogoje hranjenja so se opredelila bolj določena priporočila.

— Glavne razlike med drugo različico smernice za preskušanje razmnoževanja (TG 211, 1998) in to različico so:

— dodan je bil Dodatek 7 za opis postopkov opredeljevanja spola novorojenih živali, če je to potrebno. V skladu s prejšnjimi različicami te preskusne metode je razmerje med spoloma izbirna končna točka;

— spremenljivka odziva, in sicer število živih potomcev, ustvarjenih na preživelega starša, je bila dopolnjena z dodatno spremenljivko odziva za razmnoževanje vrste Daphnia, tj. skupnim številom živih potomcev, ustvarjenih ob koncu preskusa, na starša vodne bolhe na začetku preskusa, pri čemer se je iz analize izključila naključna in/ali nenamerna smrtnost staršev. Namen dodane spremenljivke odziva je uskladiti to spremenljivko odziva z drugimi preskusnimi metodami za razmnoževanje nevretenčarjev. Poleg tega se v zvezi s to spremenljivko odziva lahko odstrani vir napake v tej preskusni metodi, in sicer učinek nenamerne in/ali naključne smrtnosti staršev, če se pojavi v obdobju izpostavljenosti;

— vključene so bile dodatne statistične smernice za načrt preskusa in obdelavo rezultatov za ECx (npr. EC10 ali EC50) in pristop NOEC/LOEC;

— uveden je bil mejni preskus.

Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

Glavni cilj preskusa je oceniti vpliv kemikalij na sposobnost razmnoževanja vrste *Daphnia magna*. V ta namen se mlade samice vrste *Daphnia* (starši), ki so na začetku preskusa mlajše od 24 ur, izpostavijo preskusni kemikaliji, dodani vodi v različnih koncentracijah. Preskus traja 21 dni. Na koncu preskusa se oceni skupno število ustvarjenih živih potomcev. Sposobnost razmnoževanja staršev je mogoče izraziti tudi na druge načine (npr. število živih potomcev, ki jih ustvari žival na dan od prvega dne, ko so opaženi potomci), vendar je treba te navesti v poročilu poleg skupnega števila živih potomcev, ustvarjenih ob koncu preskusa. Zaradi posebnega načrta polstatičnega preskusa v primerjavi z drugimi preskusnimi metodami za razmnoževanje nevretenčarjev se lahko prešteje tudi število

▼M7

živih potomcev, ki jih ustvari vsak posamezni starš. V nasprotju z drugimi preskusnimi metodami za razmnoževanje nevretenčarjev to omogoča, da se ustvarjanje potomcev starša, ki naključno in/ali nenamerno umre med preskusnim obdobjem, izključi iz ocene podatkov. Če se torej smrtnost staršev pojavi v izpostavljenih ponovljenih vzorcih, je treba obravnavati, ali smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo ali ne, npr. če obstaja precejšnja regresija odziva v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije s pozitivnim naklonom (za to se lahko uporabi statistični preskus, kot je Cochran-Armitageov trendnostni test). Če smrtnost ne sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba navedene ponovljene vzorce s smrtnostjo staršev izključiti iz analize preskusnega rezultata. Če smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba smrtnost staršev obravnavati kot učinek preskusne kemikalije, ponovljeni vzorci pa se ne smejo izključiti iz analize. Če starš med preskusom umre, tj. naključno zaradi neustreznega ravnanja ali nesreče, ali nenamerno zaradi nepojasnjenega dogodka, ki ni povezan z učinkom preskusne kemikalije, ali pa se izkaže, da je samec, se ponovljeni vzorec izključi iz analize (glej več v odstavku 51). Toksični učinek preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja se izrazi kot ECx, tako da se podatke prilagodi ustreznemu modelu z nelinearno regresijo, da se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje sposobnosti razmnoževanja, ali pa kot vrednost NOEC/LOEC (4). *Preskusne koncentracije morajo po možnosti oklepati najnižjo od uporabljenih učinkovitih koncentracij (npr. EC_{10}), kar pomeni, da se ta vrednost izračuna z interpolacijo, ne pa z ekstrapolacijo.*

V poročilu je treba navesti tudi preživetje staršev in trajanje obdobja do ustvarjanja prvega zaroda. Proučijo se lahko tudi drugi učinki, ki so povezani s kemikalijo in vplivajo na parametre, kot so rast (npr. dolžina) in morebiti intrinzična hitrost povečanja populacije (glej odstavek 44).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

Rezultati preskusa akutne toksičnosti (glej poglavje C.2 te priloge: Preskus akutne imobilizacije vodnih bolh (*Daphnia* sp.)), izvedeni z vrsto *Daphnia magna*, so lahko uporabni pri izbiri ustreznega območja preskusnih koncentracij v preskusih razmnoževanja. Znana morata biti topnost v vodi in parni tlak preskusne kemikalije ter na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za količinsko opredeljevanje kemikalije v preskusnih raztopinah, za katero obstajajo podatki o izkoristku in meji določljivosti.

Informacije o preskusni kemikaliji, ki so lahko uporabne pri določanju preskusnih pogojev, zajemajo strukturno formulo, čistost kemikalije, obstojnost na svetlobi, obstojnost pod pogoji preskusa, disociacijsko konstanto (pKa), P_{ow} in rezultate preskusa za dobro biorazgradljivost (glej poglavji C.4 (Določanje „dobre“ biorazgradljivosti) in C.29 (Dobra biorazgradljivost – CO_2 v zaprtih posodah) te priloge).

VELJAVNOST PRESKUSA

Za veljavnost preskusa morajo kontrole izpolnjevati naslednja merila za učinkovitost:

— smrtnost staršev (samic vrste *Daphnia*) ob koncu preskusa ne presega 20 %;

— povprečno število živih potomcev na starša, ki preživi do konca preskusa, $\geq$ 60.

Opomba: Enako merilo za veljavnost (20 %) se lahko uporabi za naključno ali nenamerno smrtnost staršev za kontrole in vsako od preskusnih koncentracij.

▼M7

OPIS METODE

Oprema

Preskusne posode in druge naprave, ki pridejo v stik s preskusnimi raztopinami, morajo biti v celoti iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Preskusne posode so navadno steklene čaše.

Potrebna je tudi nekatera ali vsa naslednja oprema:

— oksimeter (z mikroelektrodo ali drugo primerno opremo za merjenje raztopljenega kisika v vzorcih z majhno prostornino);

— ustrezna oprema za uravnavanje temperature;

— merilnik vrednosti pH;

— oprema za določanje trdote vode;

— oprema za določanje koncentracije skupnega organskega ogljika (TOC) v vodi ali oprema za določanje kemijske potrebe po kisiku (KPK);

— primerna naprava za nadzorovanje sistema osvetlitve in merjenje svetilnosti.

Preskusni organizem

V preskusu se uporabi vrsta *Daphnia magna* Straus ([1]).

Klon mora po možnosti biti opredeljen z genotipiziranjem. Raziskave (1) so pokazale, da sposobnost razmnoževanja klona A (ki izvira iz IRCHA v Franciji) (5) dosledno izpolnjuje merilo za veljavnost, ki zahteva, da je povprečno število živih potomcev na preživelega starša ≥ 60, če so gojeni v pogojih, opisanih v tej preskusni metodi. Vendar so sprejemljivi tudi drugi kloni, če se dokaže, da kultura vrste *Daphnia* izpolnjuje merila za veljavnost preskusa.

Na začetku preskusa morajo biti živali mlajše od 24 ur in ne smejo biti prva generacija potomcev. Izvirati morajo iz zdravega staleža (tj. ne kažejo znakov stresa, kot so visoka smrtnost, navzočnost samcev in zimskih jajc, zamuda pri ustvarjanju prvega zaroda, razbarvane živali itd.). Živali v staležu je treba gojiti v pogojih (svetloba, temperatura, medij, hranjenje in živali na enoto prostornine), podobnim tistim, ki bodo uporabljeni v preskusu. Če se bo v preskusu uporabilo gojišče za vrsto *Daphnia*, ki je drugačno od tistega, ki se uporablja za rutinsko gojenje kulture vrste *Daphnia*, je dobro pred preskusom izvesti obdobje aklimatizacije, ki navadno traja okoli tri tedne (tj. eno generacijo), da se prepreči izpostavljanje staršev stresu.

Preskusni medij

Za ta preskus je priporočljivo uporabiti povsem določen medij. S tem se je mogoče izogniti uporabi dodatkov (npr. morske alge, ekstrakt tal itd.), ki jih je težko opredeliti, s tem pa se izboljšajo možnosti za standardizacijo med laboratoriji. Ugotovljeno je bilo, da sta medija Elendt M4 (6) in M7 (glej Dodatek 2) primerna za ta namen. Sprejemljivi pa so tudi drugi mediji (npr. (7) in (8)), če je dokazano, da sposobnost kulture vrste *Daphnia* izpolnjuje merila za veljavnost preskusa.

([1]) Lahko se uporabijo druge vrste vodnih bolh, če ustrezno izpolnjujejo merila za veljavnost (merilo za veljavnost v zvezi s sposobnostjo razmnoževanja v kontrolah mora biti ustrezno za *vse* vrste). Če se uporabijo druge vrste *vodnih bolh*, jih je treba jasno opredeliti in utemeljiti njihovo uporabo.

▼M7

Če se uporabijo mediji, ki vsebujejo neopredeljene dodatke, je treba te dodatke jasno navesti, v poročilu o preskusu pa je treba zagotoviti informacije o sestavi, zlasti v zvezi z vsebnostjo ogljika, saj lahko vpliva na uporabljeno hrano. Priporočeno je določiti skupni organski ogljik (TOC) in/ali kemijsko potrebo po kisiku (KPK) osnovnega pripravka organskega dodatka ter oceniti, kako ta posledično prispeva k TOC/KPK v ustvarjenem preskusnem mediju. Nadalje je priporočeno, da ravni TOC v mediju (tj. pred dodatkom alg) znašajo manj kot 2 mg/l (9).

Pri preskušanju kemikalij, ki vsebujejo kovine, je pomembno vedeti, da lahko lastnosti preskusnega medija (npr. trdota, sposobnost tvorbe kelatov) vplivajo na toksičnost preskusne kemikalije. Zato je zaželen povsem določen medij. Trenutno pa sta edina povsem določena medija, za katera je dokazano, da sta primerna za dolgotrajno gojenje vrste *Daphnia magna*, Elendt M4 in M7. Oba medija vsebujeta kelatni reagent EDTA. Raziskave so pokazale (2), da je „navidezna toksičnost“ kadmija na splošno manjša, kadar se preskus razmnoževanja izvede v medijih M4 in M7, kot pa če se izvede v medijih, ki ne vsebujejo EDTA. M4 in M7 zato nista priporočljiva za preskušanje kemikalij, ki vsebujejo kovine, izogibati pa se je treba tudi drugim medijem, ki vsebujejo znane kelatne reagente. Za kemikalije, ki vsebujejo kovine, je morda priporočljivo uporabiti drug medij, kot je na primer modelna razredčevalna trda sladka voda ASTM (9), ki ne vsebuje EDTA. Kombinacija modelne razredčevalne trde sladke vode ASTM in ekstrakta morskih alg (10) je primerna za dolgotrajno gojenje vrste *Daphnia magna* (2).

Raztopljena koncentracija kisika mora znašati več kot 3 mg/l ob začetku preskusa in med njim. Vrednost pH mora biti v območju 6–9 in običajno ne sme odstopati za več kot 1,5 enote v katerem koli preskusu. Priporočena je trdota nad 140 mg/l (kot $CaCO_3$). Pri preskusih na tej ravni in nad njo je bila ugotovljena sposobnost razmnoževanja, ki je v skladu z merili za veljavnost (11) in (12).

Preskusne raztopine

Preskusne raztopine izbranih koncentracij se običajno pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Če je mogoče, se osnovne raztopine pripravijo brez kakršnih koli topil ali disperzijskih sredstev, z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v preskusnem mediju z mehanskimi postopki, kot so stresanje, mešanje ali ultrazvočno razbijanje, ali drugimi ustreznimi metodami. Priporočeno je, da se preskusne sisteme izpostavi koncentracijam preskusne kemikalije, ki bodo uporabljene v študiji, za tako dolgo, kot je potrebno, da se dokaže ohranjanje obstojnih koncentracij izpostavljenosti, preden se doda preskusne organizme. Če je preskusno kemikalijo težko raztopiti v vodi, je treba slediti postopkom, ki so opisani v smernici OECD za ravnanje z zahtevnimi snovmi (13). Uporabi topil ali disperzijskih sredstev se je treba izogniti, vendar je v nekaterih primerih morda potrebna za pripravo osnovne raztopine z ustrezno koncentracijo za odmerjanje.

Poleg preskusnih koncentracij je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje z ustreznimi ponovljenimi vzorci in, če se temu ne da izogniti, kontrolo s topilom z ustreznimi ponovljenimi vzorci. V preskusu je treba uporabiti samo topila ali disperzijska sredstva, za katera je bilo dokazano, da nimajo znatnega učinka na spremenljivko odziva ali pa imajo nanjo le manjši učinek. Primeri ustreznih topil (npr. aceton, etanol, metanol, dimetilformamid in trietilen glikol) ter disperzijskih

▼M7

sredstev (npr. Cremophor RH40, 0,01-odstotna metilceluloza in HCO-40) so navedeni v (13). Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, njegova končna koncentracija ne sme biti višja od 0,1 ml/l (13) in v vseh preskusnih posodah mora biti ista koncentracija, razen v kontroli z vodo za redčenje. Čim bolj pa si je treba prizadevati, da so koncentracije topil čim nižje.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

Preskus traja 21 dni.

Obremenitev

Starši se gojijo ločeno, en na preskusno posodo, običajno z 50–100 ml (za vrsto *Daphnia magna*, možne pa so tudi manjše prostornine, zlasti za manjše vrste vodnih bolh, npr. *Ceriodaphnia dubia*) medija v vsaki posodi, razen če je za preskušanje potreben pretočni načrt preskusa.

Včasih so morda potrebne večje prostornine za izpolnitev zahtev analitskega postopka, ki se uporabi za določanje koncentracije preskusne kemikalije, za kemijsko analizo pa se lahko ponovljeni vzorci tudi združijo. Če se uporabijo prostornine, večje od 100 ml, je morda treba povečati obroke za vrsto *Daphnia*, da se zagotovi zadostna dostopnost hrane in skladnost z merili za veljavnost.

Poskusne živali

Pri polstatičnih preskusih se goji vsaj deset živali posamezno za vsako preskusno koncentracijo in vsaj deset živali posamezno za kontrolno serijo.

Pri pretočnih preskusih je bilo ugotovljeno, da je ustrezno razdeliti 40 živali v štiri skupine po deset živali za vsako preskusno koncentracijo (1). Uporabi se lahko manjše število preskusnih organizmov, priporočeno pa je najmanj 20 živali na koncentracijo, ki so razdeljene v dva ali več ponovljenih vzorcev z enakim številom živali (npr. štiri ponovljeni vzorci, vsak s petimi vodnimi bolhami). Opozoriti je treba, da pri preskusih, v katerih se živali gojijo v skupinah, ne bo iz statistične analize mogoče izključiti nobenih potomcev, če pride do nenamerne/naključne smrtnosti staršev po začetku razmnoževanja, zato je v takih primerih treba izraziti sposobnost razmnoževanja kot skupno število živih potomcev, ustvarjenih na starša iz skupine na začetku preskusa.

Tretiranja, ki se dodelijo preskusnim posodam, in vsa nadaljnja ravnanja s preskusnimi posodami, morajo biti naključna. Če ni, lahko pride do pristranskosti, ki bi se lahko razumela kot učinek koncentracije. Zlasti če se s preskusnimi enotami ravna po vrstnem redu tretiranj ali koncentracij, lahko nek učinek, odvisen od časa, kot je utrujenost izvajalca ali druga napaka, pomeni večje učinke pri višjih koncentracijah. Poleg tega, če bodo na rezultate preskusa verjetno vplivali začetni ali okoljski pogoji preskusa, na primer položaj v laboratoriju, je treba obravnavati načrt preskusa z naključnimi bloki.

Hranjenje

Pri polstatičnih preskusih je treba živali po možnosti hraniti vsak dan oziroma vsaj trikrat na teden (tj. skladno s spremembami medija). Upoštevati je treba morebitno razredčenje koncentracij izpostavljenosti zaradi dodajanja hrane in ga čim bolj preprečiti z ustreznimi koncentracijami suspenzij alg. Odstopanja od tega (npr. za pretočne preskuse) je treba navesti v poročilu.

Med preskusom mora biti hrana staršev po možnosti sestavljena iz živih celic alg ene ali več naslednjih vrst: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (prej znana kot *Selenastrum capricornutum*) in *Desmodesmus subspicatus* (prej znana kot *Scenedesmus subspicatus*). Hrana mora temeljiti na količini organskega ogljika (C), ki se zagotovi za vsakega starša. Raziskave (14) so pokazale, da

▼M7

je velikost obrokov med 0,1 in 0,2 mg C/*vodno bolho*/dan za vrsto *Daphnia magna* dovolj, da se doseže zahtevano število živih potomcev in izpolnijo merila za veljavnost preskusa. Obroki se lahko zagotavljajo z enako stopnjo hranjenja ves čas trajanja preskusa, po želji pa se lahko na začetku preskusa uporabi nižja stopnja in se nato med preskusom povečuje, da se upošteva rasti staršev. V tem primeru morajo biti obroki še vedno ves čas v priporočenem območju, ki znaša 0,1–0,2 mg C/*vodno bolho*/dan.

Če se morajo za zagotavljanje zahtevane stopnje obroka uporabiti nadomestne meritve, kot sta število celic alg ali absorbanca svetlobe (tj. zaradi večje pripravnosti, saj je merjenje vsebnosti ogljika zamudno), mora vsak laboratorij pripraviti svoj nomogram, ki povezuje nadomestno meritev z vsebnostjo ogljika v kulturi alg (glej Dodatek 3 za nasvete o izdelavi nomogramov). Nomograme je treba preveriti vsaj enkrat letno in bolj pogosto, če se spremenijo pogoji gojenja alg. Ugotovljeno je bilo, da je absorbanca svetlobe boljše nadomestilo za vsebnost ogljika kot število celic (15).

Vrsto *Daphnia* je treba hraniti s koncentrirano suspenzijo alg, da se čim bolj zmanjša prostornina gojišča alg, ki je bil prenesen v preskusne posode. Koncentracijo alg se lahko doseže s centrifugiranjem, ki mu sledi ponovno suspendiranje v gojišču za vrsto *Daphnia*.

Svetloba

16 ur svetlobe s svetilnostjo, ki ne presega 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ in se izmeri na površini vode v posodi. Pri merilnikih svetlobe, umerjenih v luksih, enakovredno območje 1 000–1 500 luksov za hladno belo svetlobo približno ustreza priporočeni svetilnosti 15–20 μE·m-2·s-1).

Temperatura

Temperatura preskusnega medija mora biti v območju 18–22 °C. Pri katerem koli preskusu pa temperatura ne sme odstopati za več kot 2 °C od teh mej dnevnega območja (npr. 18–20, 19–21 ali 20–22 °C). Za spremljanje temperature je morda ustrezno uporabiti dodatno preskusno posodo.

Prezračevanje

Preskusne posode se med preskusom ne smejo prezračevati.

Načrt preskusa

Preskus za določanje območja

Po potrebi se preskus za določanje območja izvede na primer s petimi koncentracijami preskusne kemikalije in dvema ponovljenima vzorcema za vsako tretiranje in kontrolo. Pri odločanju o območju koncentracij, ki jih je treba uporabiti pri preskusu za določanje območja, so lahko uporabne tudi dodatne informacije o akutni toksičnosti za vrsto *Daphnia* in/ali druge vodne organizme iz preskusov s podobnimi kemikalijami ali virov.

Preskus za določanje območja traja 21 dni ali tako dolgo, da se lahko zanesljivo predvidijo ravni učinkov. Na koncu preskusa se oceni razmnoževanje vrste *Daphnia*. Zabeležiti je treba število odraslih in pojav potomcev.

Končni preskus

Običajno se uporabi vsaj pet preskusnih koncentracij, ki oklepajo učinkovito koncentracijo (npr. EC_x) in so razvrščene v geometrijskem zaporedju z razmerjem, ki po možnosti ne presega 3,2. Uporabiti je treba ustrezno število ponovljenih vzorcev za vsako preskusno koncentracijo (glej odstavke 24–25). Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Kemikalije se ne smejo preskušati nad njihovo mejo topnosti v preskusnem mediju. Pred izvedbo

▼M7

preskusa je priporočljivo obravnavati statistično moč načrta preskusov in uporabo ustreznih statističnih metod (4). Pri določanju območja koncentracij je treba upoštevati naslednje:

(i) kadar se ocenjuje EC_x za učinke na razmnoževanje, je priporočljivo uporabiti zadostne koncentracije, da se lahko EC_x določi z ustrezno stopnjo zaupanja. Preskusne koncentracije morajo po možnosti oklepati ocenjeni EC_x tako, da se EC_x ugotovi z interpolacijo in ne z ekstrapolacijo. Za naslednjo statistično analizo je bolje imeti več preskusnih koncentracij (npr. deset) in manj ponovljenih vzorcev vsake koncentracije (npr. pet, pri čemer skupno število posod ostane enako) ter deset kontrol;

(ii) pri ocenjevanju LOEC in/ali NOEC mora biti najnižja preskusna koncentracija dovolj nizka, da sposobnost razmnoževanja pri tej koncentraciji ni znatno nižja kot ta v kontroli. Če ni tako, je treba preskus ponoviti z manjšo najnižjo koncentracijo;

(iii) pri ocenjevanju LOEC in/ali NOEC mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj visoka, da sposobnost razmnoževanja pri tej koncentraciji ni znatno nižja kot ta v kontroli. Če ni tako, je treba preskus ponoviti z večjo najvišjo koncentracijo, razen če je bila kot najvišja preskusna koncentracija v začetnem preskusu uporabljena najvišja zahtevana preskusna koncentracija za preskušanje kroničnih učinkov (tj. 10 mg/l).

Če pri najvišji koncentraciji v preskusu za določanje območja (npr. pri 10 mg/l) niso ugotovljeni učinki ali če je zelo verjetno, da ima preskusna kemikalija nizko toksičnost/ni toksična na podlagi pomanjkanja toksičnosti za druge organizme in/ali nizke absorpcije/ni absorpcije, se lahko preskus razmnoževanja izvede kot mejni preskus, pri čemer se uporabi preskusna koncentracija, ki znaša npr. 10 mg/l, in kontrola. Uporabiti je treba deset ponovljenih vzorcev za tretirano in kontrolno skupino. Če je treba mejni preskus izvesti v pretočnem sistemu, je ustrezno uporabiti manj ponovljenih vzorcev. Z mejnim preskusom se lahko dokaže, da pri mejni koncentraciji ni statistično značilnega učinka, če pa se zabeležijo učinki, je običajno treba izvesti popoln preskus.

Kontrole

Poleg preskusne serije je treba izvesti kontrolno serijo z enim preskusnim medijem in, če je ustrezno, eno kontrolno serijo s topilom ali disperzijskim sredstvom. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, mora biti njegova koncentracija enaka tisti, ki je uporabljena v posodah s preskusno kemikalijo. Uporabiti je treba ustrezno število ponovljenih vzorcev (glej odstavke 23–24).

Na splošno bi moral pri pravilno izvedenem preskusu koeficient variacije pri povprečnem številu živih potomcev na starša v kontrolah znašati $\leq$ 25 %, kar je treba navesti pri načrtih preskusa, pri katerih se uporabljajo živali, ki se gojijo posamezno.

Obnavljanje preskusnega medija

Pogostost obnavljanja medija je sicer odvisna od obstojnosti preskusne kemikalije, vendar ga je treba obnavljati vsaj trikrat na teden. Če je iz predhodnih preskusov obstojnosti (glej odstavek 7) razvidno, da koncentracija preskusne kemikalije ni obstojna (tj. ni v območju 80–120 % nominalne ali pade pod 80 % izmerjene začetne koncentracije) v najdaljšem obdobju obnavljanja (tj. tri dni), je treba obravnavati pogostejše obnavljanje medija ali uporabo pretočnega preskusa.

▼M7

Kadar se pri polstatičnih preskusih obnavlja medij, se pripravi druga serija preskusnih posod, vanje pa se prenese starše, na primer s stekleno pipeto ustreznega premera. Prostornina medija, prenesenega z vrsto *Daphnia*, mora biti čim manjša.

Opazovanja

Rezultate opazovanj med preskusom je treba zabeležiti na podatkovnih listih (glej primere v Dodatkih 4 in 5). Če so zahtevane druge meritve (glej odstavek 44), bodo morda potrebna dodatna opazovanja.

Potomci

Po možnosti je treba odstraniti potomce vsakega starša in jih prešteti vsak dan od pojava prvega zaroda, da ne bi jedli hrane, namenjene staršem. Za namen te metode je treba prešteti samo število živih potomcev, vendar je treba zabeležiti prisotnost nedozorelih jajčec ali mrtvih potomcev.

Smrtnost

Smrtnost med starši je treba po možnosti beležiti vsak dan ali vsaj tako pogosto, kot se štejejo potomci.

Drugi parametri

Čeprav je ta preskusna metoda zasnovana predvsem za ocenjevanje učinkov na sposobnost razmnoževanja, se morda lahko v zadostni meri količinsko opredelijo tudi drugi učinki, ki omogočajo statistično analizo. Lahko se zabeleži sposobnost razmnoževanja na preživelega starša, tj. število živih potomcev, ustvarjenih med preskusom na preživelega starša. To se lahko primerja z glavno spremenljivko odziva (sposobnost razmnoževanja na starša na začetku preskusa, ki ni nenamerno ali naključno umrl med preskusom). Če se smrtnost staršev pojavi v izpostavljenih ponovljenih vzorcih, je treba obravnavati, ali smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo ali ne, npr. če obstaja precejšnja regresija odziva v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije s pozitivnim naklonom (za to se lahko uporabi statistični preskus, kot je Cochran-Armitagev trendnostni test). Če smrtnost ne sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba navedene ponovljene vzorce s smrtnostjo staršev izključiti iz analize preskusnega rezultata. Če smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba smrtnost staršev obravnavati kot učinek preskusne kemikalije, ponovljeni vzorci pa se ne smejo izključiti iz analize preskusnega rezultata. Meritve rasti so zelo zaželene, saj zagotovijo informacije o morebitnih subletalnih učinkih, ki so lahko uporabne poleg zgolj meritev razmnoževanja; priporočeno je merjenje dolžine staršev (tj. dolžine telesa, razen analne osti) na koncu preskusa. Drugi parametri, ki se lahko izmerijo ali izračunajo, zajemajo obdobje do ustvarjanja prvega zaroda (in nadaljnjih zarodov), število in velikost zarodov na žival, število nedozorelih zarodov, prisotnost novorojenih samcev (OECD 2008) ali zimskih jajc ter morebiti intrinzično hitrost povečanja populacije (glej Dodatek 1 za opredelitve in Dodatek 7 za opredeljevanje spola novorojenih živali).

Pogostost analitskega določanja in meritev

Koncentracijo kisika, temperaturo, trdoto in vrednosti pH je treba meriti vsaj enkrat tedensko v svežih in starih medijih, kontrolah in najvišjih koncentracijah preskusne kemikalije.

Med preskusom se v rednih časovnih intervalih določajo koncentracije preskusne snovi.

Kadar se pri polstatičnih preskusih pričakuje, da bo koncentracija preskusne kemikalije ostala v območju ± 20 % nominalne vrednosti (tj. v območju 80–120 % – glej odstavke 6, 7 in 39), je priporočeno, da se analizirajo vsaj najvišje in najnižje preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene, in ob

▼M7

enem obnavljanju v prvem tednu preskusa (tj. analize je treba izvesti na vzorcu iz iste raztopine – ko je sveže pripravljena in ob obnavljanju). Te določitve je nato treba ponavljati najmanj enkrat tedensko.

Kadar se pri preskusih ne pričakuje, da bo koncentracija preskusne kemikalije ostala v območju ± 20 % nominalne vrednosti, je treba analizirati vse preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene in ob obnavljanju. Kadar pa pri preskusih izmerjena začetna koncentracija preskusne kemikalije ni v območju ± 20 % nominalne vrednosti, ampak se lahko zagotovijo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetnih koncentracij), se kemijske določitve v drugem in tretjem tednu preskusa lahko zmanjšajo na najvišje in najnižje preskusne koncentracije. V vsakem primeru pa je treba koncentracije preskusne kemikalije pred obnavljanjem določiti samo za eno posodo s ponovljenim vzorcem pri vsaki preskusni koncentraciji.

Če se uporabi pretočni preskus, je ustrezno uporabiti podoben časovni razpored vzorčenja, kot je opisan za polstatične preskuse (toda v tem primeru se ne merijo „stare“ raztopine). Morda pa bi bilo priporočljivo povečati število vzorčenj v prvem tednu (npr. tri serije meritev), da se zagotovi ohranjanje obstojnosti preskusnih koncentracij. Pri teh vrstah preskusa je treba vsakodnevno preverjati pretok razredčila in preskusne kemikalije.

Če obstajajo dokazi, da je bila koncentracija preiskovane kemikalije ves čas trajanja preskusa ustrezno v območju ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije, lahko rezultati temeljijo na nominalni ali izmerjeni začetni vrednosti. Če je odstopanje od nominalne ali izmerjene začetne koncentracije večje od ± 20 %, je treba rezultate izraziti v smislu tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu (glej smernice za izračun iz Dodatka 6).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

Namen tega preskusa je določiti učinke preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja. Skupno število živih potomcev na starša je treba izračunati za vsako preskusno posodo (tj. ponovljeni vzorec). Poleg se lahko razmnoževanje izračuna na podlagi živih potomcev, ki jih ustvari preživeli starš. Ekološko najpomembnejša spremenljivka odziva pa je skupno število živih potomcev, ustvarjenih na starša, ki ne umre naključno ([1]) ali nenamerno ([2]) med preskusom. Če starš med preskusom naključno ali nenamerno umre, ali pa se izkaže, da je samec, se ponovljeni vzorec izključi iz analize. Analiza bo potem temeljila na zmanjšanem številu ponovljenih vzorcev. Če se smrtnost staršev pojavi v izpostavljenih ponovljenih vzorcih, je treba obravnavati, ali smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo ali ne, npr. če obstaja precejšnja regresija odziva v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije s pozitivnim naklonom (za to se lahko uporabi statistični preskus, kot je Cochran-Armitagev trendnostni test). Če smrtnost ne sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba navedene ponovljene vzorce s smrtnostjo staršev izključiti iz analize preskusnega rezultata. Če smrtnost sledi vzorcu odziva na koncentracijo, je treba smrtnost staršev obravnavati kot učinek preskusne kemikalije, ponovljeni vzorci pa se ne smejo izključiti iz analize preskusnega rezultata.

Torej kadar se za izražanje učinkov uporabijo LOEC in NOEC ali EC_x, je priporočeno, da se učinek na razmnoževanje izračuna z obema navedenima spremenljivkama odziva, tj.

([1]) Naključna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in jo povzroči naključni dogodek (tj. znani vzrok).

([2]) Nenamerna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in nima znanega vzroka.

▼M7

— kot skupno število živih potomcev, ustvarjenih na starša, ki ne umre naključno ali nenamerno med preskusom, in

— kot število živih potomcev, ustvarjenih na preživelega starša,

nato pa se kot končni rezultat uporabi najnižja vrednost NOEC in LOEC ali EC_x, ki se izračuna z eno od teh dveh spremenljivk odziva.

Preden se uporabi statistična analiza, npr. postopki analize variance, primerjava tretiranj s kontrolami s Studentovim t-testom, Dunnettovim testom, Williamsovim testom ali testom po Jonckheere-Terpstraju, je priporočeno obravnavati pretvorbo podatkov, če je ta potrebna za izpolnitev zahtev določenega statističnega testa. V okviru drugih, neparametričnih možnosti se lahko obravnava Dunnov ali Mann-Whitneyjev test. Za povprečja posameznih tretiranj se izračunajo 95-odstotni intervali zaupanja.

Število preživelih staršev v netretiranih kontrolah je merilo za veljavnost, ki ga je treba dokumentirati in navesti v poročilu. V končnem poročilu je treba navesti tudi vse druge škodljive učinke, npr. nenavadno vedenje in pomembne toksikološke ugotovitve.

ECx

Vrednosti ECx, vključno z njihovimi pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi mejami zaupanja, se izračunajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. logistično ali Weibullovo funkcijo, prilagojeno Spearman-Karberjevo metodo ali enostavno interpolacijo). Za izračun EC10, EC_{50} ali katere koli druge vrednosti ECx je treba celoten nabor podatkov analizirati z regresijsko analizo.

NOEC/LOEC

Če je namen statistične analize določiti NOEC/LOEC, je treba uporabiti ustrezne statistične metode v skladu z dokumentom OECD št. 54 z naslovom Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (4). Na splošno se neželeni učinki preskusne kemikalije v primerjavi s kontrolo proučujejo s preskušanjem enostransko zastavljene hipoteze pri $p \leq 0,05$.

Normalna porazdelitev in homogenost varianc se lahko preskusita z ustreznim statističnim testom, npr. Shapiro-Wilkovim testom oziroma Levenovim testom ($p \leq 0,05$). Izvedejo se lahko enofaktorska analiza variance (ANOVA) in nadaljnje metode večkratne primerjave. Preskusi večkratne primerjave (npr. Dunnettov test) ali večstopenjski trendnostni testi (npr. Williamsov test ali test po Jonckheere-Terpstraju) se lahko uporabijo za izračun, ali obstajajo znatne razlike ($p \leq 0,05$) med kontrolami in različnimi koncentracijami preskusne kemikalije (izbira priporočenega testa v skladu z Dokumentom s smernicami OECD št. 54 (4)). V nasprotnem primeru se lahko za določanje vrednosti NOEC in LOEC uporabijo neparametrične metode (npr. Bonferronijev U-test po Holmu ali trendnostni test po Jonckheere-Terpstraju).

Mejni test

Če je bil izveden mejni test (primerjava kontrole in samo ene tretirane skupine) in so izpolnjeni predpogoji za postopke parametričnih testov (normalnost, homogenost), je mogoče s Studentovim testom (t-testom) ovrednotiti odzive metrik. Če te zahteve niso izpolnjene, se lahko uporabi t-test za neenake variance (na primer Welchev t-test) ali neparametrični test, kot je Mann-Whitneyjev U-test.

Za določanje značilnih razlik med kontrolami (kontrolo in kontrolo s topilom ali kontrolo z disperzijskim sredstvom) se lahko preskusijo ponovljeni vzorci vsake kontrole, kot je opisano za mejni preskus. Če ti preskusi ne zaznajo značilnih razlik, se lahko združijo vsi kontrolni ponovljeni vzorci in kontrolni ponovljeni vzorci s topilom. V nasprotnem primeru je treba vse tretirane vzorce primerjati s kontrolo s topilom.

▼M7

Poročilo o preskusu

V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— agregatno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, vključno s čistostjo.

Preskusna vrsta:

— klon (ali je bil genetsko tipiziran), dobavitelj ali vir (če je znano) in uporabljeni pogoji gojenja. Če se ne uporabi vrsta *Daphnia magna*, ampak druga vrsta, je treba to navesti v poročilu in utemeljiti.

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (npr. polstatični ali pretočni, prostornina, obremenitev s številom vodnih bolh vrste *Daphnia* na liter);

— obdobje osvetljenosti in svetilnost;

— načrt preskusa (npr. število ponovljenih vzorcev, število staršev na ponovljeni vzorec);

— podrobnosti o uporabljenem gojišču;

— dodatki organskega materiala, če so uporabljeni, vključno s sestavo, virom, metodo priprave, TOC/KPK osnovnih pripravkov, oceno dobljenega TOC/KPK v preskusnem mediju;

— podrobne informacije o hranjenju, vključno s količino (v mg C/*vodna bolha*/dan) in časovnim razporedom (npr. vrsta hrane, pri algah vključno z določenim imenom vrste in, če je znano, sevom, pogoji gojenja);

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba topilo ali disperzijsko sredstvo in njegovo koncentracijo, če se uporabi).

Rezultati:

— rezultati kakršnih koli predhodnih študij o obstojnosti preskusne kemikalije;

— nominalne preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določanje koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah (glej primer podatkovnih listov iz Dodatka 5); v poročilu je treba navesti tudi izkoristek metode in mejo določljivosti;

— kakovost vode v preskusnih posodah (tj. pH, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika ter TOC in/ali KPK in trdota, kadar je to ustrezno) (glej primer podatkovnega lista iz Dodatka 4);

— v celoti je treba zabeležiti ustvarjanje živih potomcev na vsakega starša med preskusom (glej primer podatkovnega lista iz Dodatka 4);

— število smrti pri starših in dan posameznih smrti (glej primer podatkovnega lista iz Dodatka 4);

— koeficient variacije za sposobnost razmnoževanja v kontrolah (na podlagi skupnega števila živih potomcev na živega starša ob koncu preskusa);

— grafični prikaz skupnega števila živih potomcev, ustvarjenih na starša v vsakem ponovljenem vzorcu, pri čemer se izključijo vsi starši, ki so morda naključno ali nenamerno umrli med preskusom, v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije;

▼M7

— če je ustrezno, grafični prikaz skupnega števila živih potomcev, ustvarjenih na preživelega starša v vsakem ponovljenem vzorcu v odvisnosti od koncentracije preskusne kemikalije;

— kadar je ustrezno, najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) za razmnoževanje, vključno z opisom uporabljenih statističnih postopkov in pokazateljem tega, zaznava kako močnega učinka se lahko pričakuje (za zagotovitev tega se lahko pred preskusom izvede analiza moči), in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za razmnoževanje; informacije o tem, katera spremenljivka odziva je bila uporabljena za izračun vrednosti LOEC in NOEC (kot skupno število živih potomcev na mater, ki ni naključno ali nenamerno umrla med preskusom, ali kot skupno število živih potomcev na preživelo mater), kadar je to ustrezno, je v poročilu treba navesti tudi vrednost LOEC ali NOEC za smrtnost staršev;

— kjer je ustrezno, EC_x za razmnoževanje in intervale zaupanja (npr. 90- ali 95-odstotne) ter graf prilagojenega modela, ki je bil uporabljen za izračun te vrednosti, naklon krivulje odziva na koncentracijo in njena standardna napaka;

— drugi opaženi biološki učinki ali meritve: v poročilu je treba navesti vse druge biološke učinke, ki so bili opaženi ali izmerjeni (npr. rast staršev), vključno z ustrezno utemeljitvijo;

— razlaga kakršnega koli odstopanja od preskusne metode.

VIRI

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, Združeno kraljestvo, 20–21, marec 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment št. 6. OECD, Pariz.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 88. OECD, Pariz.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment št. 54. OECD, Pariz.

(5) Baird, D. J., idr. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257–265.

(6) Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Peta izdaja. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods.

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775–782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. V: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, zv. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D. J., idr. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. V: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Köbenhavn, 1988. (H. Løkke, H. Tyle in F. Bro-Rasmussen. Eds.) str. 144–148.

▼M7

(11) Parkhurst, B. R., J. L. Forte. G. P. in Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1–8.

(12) Cowgill, U. M. in Milazzo, D. P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185–196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment št. 23. OECD, Pariz.

(14) Sims, I. R., S. Watson in D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053–2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459–466.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

Naključna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in jo povzroči naključni dogodek (tj. znani vzrok).

Kemikalija: snov ali zmes.

Ecx: koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v vodi, ki povzroči x-odstotno zmanjšanje pri razmnoževanju vrste *Daphnia*v navedenem obdobju izpostavljenosti.

Nenamerna smrtnost: smrtnost, ki ni povezana s kemikalijo in nima znanega vzroka.

Intrinzična hitrost povečanja populacije: je merilo rasti populacije, ki združuje sposobnost razmnoževanja in smrtnost pri določeni starosti (1), (2) in (3). Pri stacionarnih populacijah je enaka nič. Pri rastočih populacijah je pozitivna, pri upadajočih pa negativna. Slednja seveda ni trajnostna in na koncu vodi k izumrtju.

Meja zaznavnosti: najnižja koncentracija, ki jo je mogoče zaznati, vendar ne količinsko opredeliti.

Meja določljivosti: najnižja koncentracija, ki jo je mogoče količinsko izmeriti.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC): je najnižja preskušena koncentracija kemikalije, pri kateri je ugotovljen statistično značilen učinek na razmnoževanje in smrtnost staršev (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo v navedenem obdobju izpostavljenosti. Toda vse koncentracije nad vrednostjo LOEC morajo imeti škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če ta dva pogoja nista izpolnjena, je treba v celoti pojasniti, kako je bila izbrana vrednost LOEC (in posledično NOEC).

Smrtnost: žival se zabeleži kot mrtva, če se ne premika, tj. če ne more plavati ali če v 15 sekundah po rahlem tresenju preskusne posode ni mogoče opaziti premikanja okončin ali postabdomna. (Če se uporabi druga opredelitev pojmov, jo je treba navesti v poročilu skupaj z virom.)

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC): preskusna koncentracija tik pod vrednostjo LOEC, ki v navedenem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$).

Potomci: so mladiči vodne bolhe vrste *Daphnia*, ki jih starši ustvarijo med preskusom.

Starši: so samice vodne bolhe vrste *Daphnia*, ki so prisotne na začetku preskusa in katerih sposobnost razmnoževanja je predmet te študije.

Sposobnost razmnoževanja: število živih potomcev, ki jih ustvarijo starši med preskusnim obdobjem.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Viri

(1) Wilson, E. O. in Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, str. 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L. L. in Boyce, M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

▼M7

Dodatek 2

PRIPRAVA POVSEM DOLOČENIH MEDIJEV ELENDT M7 IN M4

Aklimatizacija na medija Elendt M7 in M4

Nekateri laboratoriji so imeli težave pri neposrednem prenosu vrste *Daphnia* v medija M4 (1) in M7. V določeni meri pa so to uspešno rešili s postopno aklimatizacijo, tj. s prenosom iz lastnega medija v 30-odstotni, 60-odstotni in nato v 100-odstotni medij Elendt. Aklimatizacijska obdobja lahko trajajo tudi do enega meseca.

Priprava

Elementi v sledeh

Ločene osnovne raztopine (I) s posameznimi elementi v sledeh se najprej pripravijo v vodi z ustrezno čistostjo, npr. deionizirani, destilirani ali pridobljeni z obratno osmozo. Iz teh različnih osnovnih raztopin (I) se pripravi druga osnovna raztopina (II), ki vsebuje vse elemente v sledeh (kombinirana raztopina), tj.:

Osnovna raztopina I (ena snov)	Količina, dodana vodi	Koncentracija (glede na medij M4)	Za pripravo kombinirane osnovne raztopine II se vodi doda naslednje količine osnovne raztopine I	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-kratna	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-kratna	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kratna	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-kratna	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-kratna	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kratna	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-kratna	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-kratna	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-kratna	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-kratna	1,0	1,0
KI	65	20 000-kratna	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-kratna	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-kratna	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-kratna	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-kratna	—	—
Raztopini Na_2EDTA in $FeSO_4$ se pripravita ločeno, zlijeta skupaj in nato takoj avtoklavirata. S tem se dobi:				
raztopina Fe-EDTA		1 000-kratna	20,0	5,0

▼**M7**

Medija M4 in M7

Medija M4 in M7 se pripravita z osnovno raztopino II, makrohranili in vitamini na naslednji način:

	Količina, dodana vodi	Koncentracija (glede na medij M4)	Količina dodane osnovne raztopine za pripravo medija	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Osnovna raztopina II (skupni elementi v sledeh)		20-kratna	50	50
Osnovne raztopine makrohranil (ena snov)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-kratna	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-kratna	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-kratna	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-kratna	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-kratna	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-kratna	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-kratna	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-kratna	0,1	0,1
Kombinirana osnovna raztopina vitaminov	–	10 000-kratna	0,1	0,1

Kombinirana osnovna raztopina vitaminov se pripravi z dodajanjem treh vitaminov v en liter vode, kot je prikazano spodaj:

	mg/l			
tiamin hidroklorid	750	10 000-kratna		
Cianokobalamin (B_{12})	10	10 000-kratna		
Biotin	7,5	10 000-kratna		

Kombinirana osnovna raztopina vitaminov se hrani zamrznjena v majhnih enakih količinah. Vitamini se medijem dodajo tik pred uporabo.*Opomba:*
Da se prepreči obarjanje soli pri pripravi celotnega medija, se doda enake količine osnovnih raztopin v približno 500–800 ml deionizirane vode, ki se nato dopolni do enega litra.*Opomba:*
Prvi opis medija M4 je objavljen v Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M7

Dodatek 3

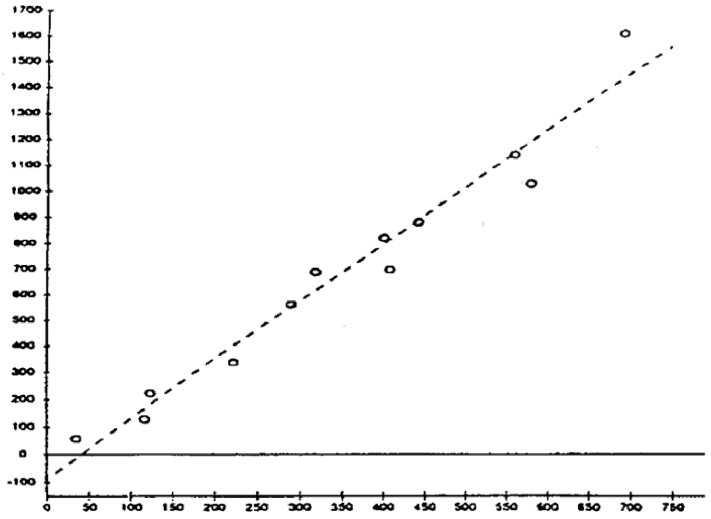
ANALIZA SKUPNEGA ORGANSKEGA OGLJIKA (TOC) IN IZDELAVA NOMOGRAMA ZA VSEBNOST TOC V HRANI IZ ALG

Ugotovljeno je bilo, da se vsebnost ogljika v hrani iz alg običajno ne meri neposredno, ampak na podlagi korelacij (tj. nomogramov) z nadomestnimi meritvami, kot sta število celic alg ali absorbanca svetlobe.

Skupni organski ogljik (TOC) je bolje meriti z visokotemperaturno oksidacijo kot pa z UV ali persulfatnimi metodami. (Za nasvet glej: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Za izdelavo nomograma je treba alge ločiti od gojišča s centrifugiranjem, ki mu sledi ponovno suspendiranje v destilirani vodi. Nadomestni parameter in koncentracija TOC za vsak vzorec se izmerita trikrat. Analizirati je treba slepe kontrolne vzorce z destilirano vodo in izpeljati koncentracijo TOC iz koncentracije TOC v vzorcu alg.

Nomogram mora biti linearen v zahtevanem območju koncentracij ogljika. Primeri so prikazani v nadaljevanju.*OPOMBA:*
ti primeri se ne smejo uporabiti za pretvorbo; ključnega pomena je, da laboratoriji pripravijo svoje nomograme.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

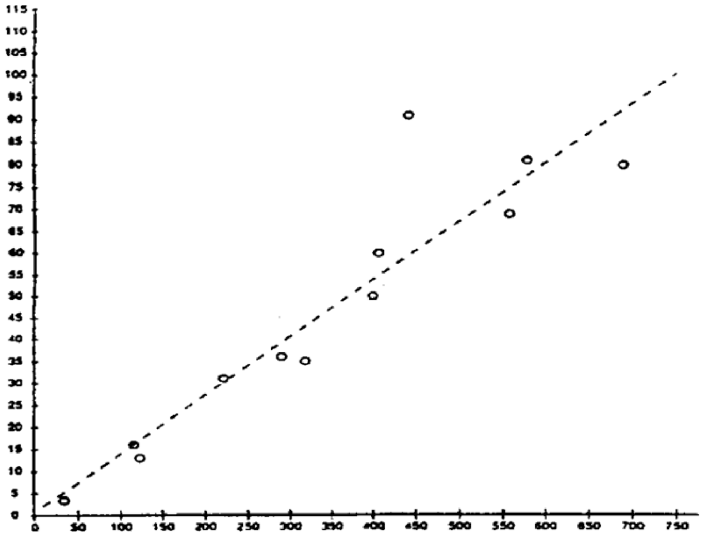
Regresija mg/l suhe teže na mg C/1. Podatki iz koncentriranih suspenzij v polkontinuirani seriji gojenih celic, ponovno suspendiranih v destilirani vodi.

os x: mg C/1 koncentrirane hrane iz alg

os y: mg/1 suhe teže koncentrirane hrane iz alg

Korekcijski koeficient -0,980

▼**M7**



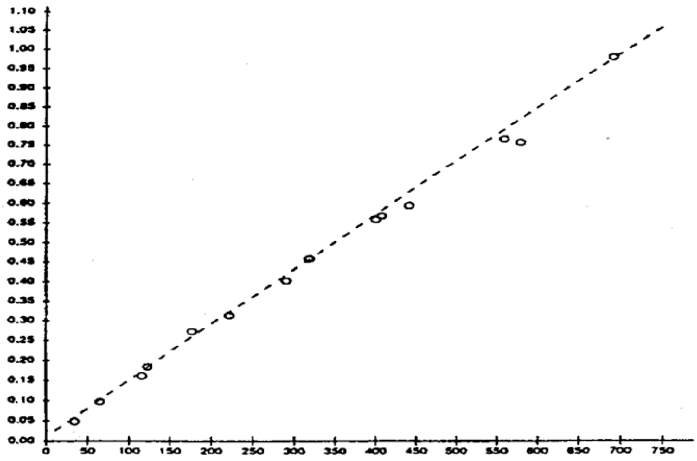
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresija števila celic na mg C/1. Podatki iz koncentriranih suspenzij v polkontinuirani seriji gojenih celic, ponovno suspendiranih v destilirani vodi.

os x: mg C/1 koncentrirane hrane iz alg

os y: št. celic/1 koncentrirane hrane iz alg

Korekcijski koeficient -0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresija absorbance na mg C/1 (1 cm dolžine poti). Podatki iz koncentriranih suspenzij v polkontinuirani seriji gojenih celic, ponovno suspendiranih v destilirani vodi.

os x: mg C/1 koncentrirane hrane iz alg

os y: absorbanca pri 440 nm pri 1/10 razredčitvi koncentrirane hrane iz alg

Korekcijski koeficient -0,998

▼M7

Dodatek 4

PRIMER PODATKOVNEGA LISTA ZA BELEŽENJE OBNAVLJANJA MEDIJEV, FIZIKALNIH/KEMIJSKIH PODATKOV O SPREMLJANJU, HRANJENJA, RAZMNOŽEVANJA VODNIH BOLH IN SMRTNOST STARŠEV

Št. preskusa	Datum začetka:						Klon:			Medij:				Vrsta hrane:				Preskusna kemikalija:					Nominalna koncentracija:	
Dan	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Obnavljanje medija (označi)																								
pH (*)																							nova	
																							stara	
O_2 (mg/l) (*)																							nova	
																							stara	
Temperatura (°C) (*)																							nova	
																							stara	
Zagotovljena hrana (označi)																								
Št. živih potomcev (**)																								Skupaj
Posoda 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼M7

Št. preskusa	Datum začetka:						Klon:			Medij:				Vrsta hrane:				Preskusna kemikalija:					Nominalna koncentracija:	
Dan	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Skupaj	
Skupna smrtnost staršev (***)																								

(*) Navedite, katera posoda je bila uporabljena za preskus.
(**) Zabeležite nedozorele zarode kot „AB“ v ustreznem okencu.
(***) Zabeležite smrtnost katerega koli starša kot „M“ v ustreznem okencu.

▼M7

Dodatek 5

PRIMER PODATKOVNEGA LISTA ZA BELEŽENJE REZULTATOV KEMIJSKE ANALIZE

(a) **Izmerjene koncentracije**

Nominalna koncentracija	Vzorec v prvem tednu		Vzorec v drugem tednu		Vzorec v tretjem tednu	
	Svež	Star	Svež	Star	Svež	Star

(b) **Izmerjene koncentracije kot odstotek nominalne vrednosti**

Nominalna koncentracija	Vzorec v prvem tednu		Vzorec v drugem tednu		Vzorec v tretjem tednu	
	Svež	Star	Svež	Star	Svež	Star

▼M7

Dodatek 6

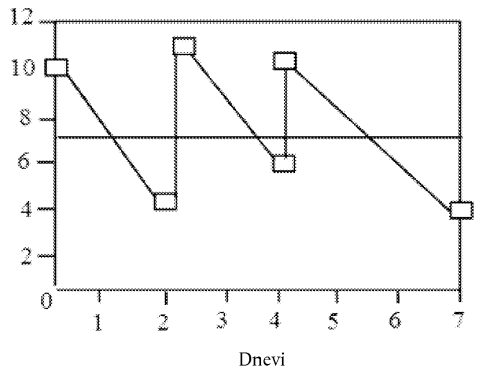
IZRAČUN TEHTANEGA POVPREČJA V DOLOČENEM ČASOVNEM INTERVALU

Tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu

Ker lahko koncentracija preskusne kemikalije v obdobju med obnavljanjem medija upade, je treba obravnavati, kakšno koncentracijo je treba izbrati kot reprezentativno za območje koncentracij, ki so jim izpostavljeni starši vrste *Daphnia*. Izbira mora temeljiti na bioloških in statističnih vidikih. Če naj bi na razmnoževanje na primer najbolj vplivala najvišja koncentracija, ki so ji živali izpostavljene, je treba uporabiti najvišjo koncentracijo. Če pa naj bi bil pomembnejši akumulirani ali dolgotrajni učinek toksične kemikalije, je ustrezneje izbrati povprečno koncentracijo. V tem primeru je ustrezno uporabiti tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu za koncentracijo, saj ta upošteva spreminjanje trenutne koncentracije v odvisnosti od časa.

Slika 1

Primer tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu



Slika 1 prikazuje primer (poenostavljenega) preskusa, ki je trajal sedem dni, medij pa se je obnavljal na dneve 0, 2 in 4.

— Tanka cikcakasta črta predstavlja koncentracijo v odvisnosti od časa. Predvideva se, da naj bi padec koncentracije sledil eksponentnemu procesu upadanja.

— Šest grafično prikazanih točk predstavlja opažene koncentracije, izmerjene na začetku in koncu vsakega obdobja obnavljanja.

— Ravna debela črta prikazuje položaj tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu.

Tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu se izračuna tako, da je površina pod tehtanim povprečjem enaka površini pod krivuljo koncentracije. Izračun za navedeni primer je prikazan v preglednici 1.

Preglednica 1

Izračun tehtanega povprečja v določenem časovnem intervalu

Obnavljanje št.	Dnevi	Koncentracija 0	Koncentracija 1	Ln (koncentracija 0)	Ln(koncentracija 1)	Površina
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Obnavljanje št.	Dnevi	Koncentracija 0	Koncentracija 1	Ln (koncentracija 0)	Ln(koncentracija 1)	Površina
Skupno dni:	7				Skupna površina:	50,092
					Tehtano povprečje:	7,156

Dnevi je število dni v obdobju obnavljanja.

Koncentracija 0 je koncentracija, izmerjena na začetku vsakega obdobja obnavljanja.

Koncentracija 1 je koncentracija, izmerjena na koncu vsakega obdobja obnavljanja.

Ln(koncentracija 0) je naravni logaritem koncentracije 0.

Ln(koncentracija 1) je naravni logaritem koncentracije 1.

Površina je površina pod eksponentno krivuljo za vsako obdobje obnavljanja. Izračuna se z enačbo:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu *(tehtano povprečje)* je *skupna površina* deljeno s *skupno dni.*

Seveda je treba za preskus razmnoževanja vrste *Daphnia* preglednico razširiti na 21 dni.

Če se opazovanja opravijo samo na začetku in na koncu vsakega obdobja obnavljanje, seveda ni mogoče potrditi, ali je proces upadanja dejansko eksponenten. Drugačna krivulja bi pomenila drugačen izračun za *površino*. Vendar eksponentni proces upadanja ni nemogoč in je verjetno najboljša krivulja, ki se lahko uporabi, če ni na voljo drugih informacij.

Previdno pa je treba obravnavati rezultate, če se s kemijsko analizo na koncu obdobja obnavljanja ne najde nobene kemikalije. Če ni mogoče oceniti, kako hitro je kemikalija izginila iz raztopine, je nemogoče dobiti realistično površino pod krivuljo, zato je tudi nemogoče dobiti ustrezno tehtano povprečje v določenem časovnem intervalu.

▼M7

Dodatek 7

SMERNICE ZA OPREDELJEVANJE SPOLA NOVOROJENIH ŽIVALI

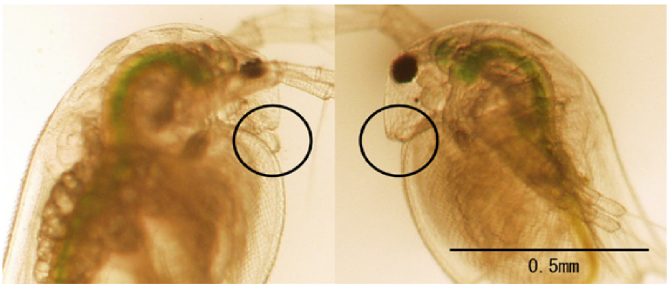
Do ustvarjanja novorojenih samcev lahko pride v spremenljivih okoljskih pogojih, kot so skrajšano obdobje osvetljenosti, temperatura, upadanje koncentracije v hrani in vedno večja gostota populacije (Hobaek in Larson, 1990; Kleiven idr., 1992). Ustvarjanje samcev je tudi znan odziv na določene regulatorje rasti žuželk (Oda idr., 2005). V pogojih, ko kemijski obremenilni dejavniki povzročajo upadanje števila za razmnoževanje sposobnih potomcev partenogenetskih samic, je mogoče pričakovati večje število samcev (OECD, 2008). Na podlagi razpoložljivih informacij ni mogoče predvideti, ali bo občutljivejše razmerje med spoloma ali končna točka razmnoževanja, obstajajo pa pokazatelji (glej „validacijsko poročilo“, del 1), da je to povečanje števila samcev morda manj občutljivo kot pa upadanje števila potomcev. Ker je glavni namen te preskusne metode oceniti število ustvarjenih potomcev, je pojavljanje samcev neobvezno opažanje. Če se ta neobvezna končna točka oceni v študiji, je treba uporabiti dodatno merilo za veljavnost preskusa z ne več kot 5 % samci v kontrolah.

Spol vrste Daphnia se najbolj praktično in preprosto ugotovi tako, da se uporabi njihove fenotipske značilnosti, saj so samci in samice genetsko identični, na določitev spola pa vpliva okolje. Samci in samice so si različni po dolžini in morfologiji sprednjih tipalk, ki so pri samcih daljše kot pri samicah (slika 1). Razliko je mogoče prepoznati takoj po rojstvu, med odraščanjem pa se razvijejo tudi druge sekundarne spolne značilnosti (npr. glej sliko 2 v Olmstead in LeBlanc, 2000).

Za ugotavljanje morfološkega spola je treba novorojene živali, ustvarjene na vsako poskusno žival, prenesi s pipeto in jih vstaviti v petrijevko s preskusnim medijem. Prostornina medija je čim manjša, da se omeji gibanje živali. Sprednje tipalke se lahko opazijo pod stereomikroskopom (10–60).

Slika 1

24-ur star samec (levo) in samica (desno) vrste *D. magna*. Samce je mogoče ločiti od samic po dolžini in morfologiji sprednjih tipalk, kot je prikazano v krogih (Tatarazako idr., 2004).



VIRI

Hobaek A. in Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255–2268.

Kleiven O. T., Larsson P., Hobaek A., 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197–206.

Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M., in Iguchi T., 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61: 1168–1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, št. 88. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

Olmstead, A. W., LeBlanc, G. A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19: 2107–2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita, M. in Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439–449.

▼B

C.21 TALNI MIKROORGANIZMI: PRESKUS TRANSFORMACIJE DUŠIKA

1. METODA

Ta preskusna metoda ustreza metodi OECD TG 216 (2000).

1.1 UVOD

Ta preskusna metoda opisuje laboratorijsko metodo, namenjeno raziskovanju dolgoročnih učinkov kemikalij po enkratni izpostavljenosti na dejavnost talnih mikroorganizmov pri transformaciji dušika. Preskus načeloma temelji na priporočilih Evropske in sredozemske organizacije za varstvo rastlin (1). Vendar so bile upoštevane tudi druge smernice, na primer smernice Nemškega zveznega zavoda za biologijo (2), Ameriške agencije za varstvo okolja (3) SET AC (4) in Mednarodne organizacije za standardizacijo (5). Na delavnici OECD o izbiri tal/usedline, ki je bila leta 1995 v Belgiratu v Italiji (6), je bil dosežen dogovor o številu in vrstah tal za uporabo v tem preskusu. Priporočila za odvzemanje, obravnavanje in shranjevanje vzorcev tal temeljijo na napotkih ISO (7) in priporočilih delavnice iz Belgirata. Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih lastnosti preskusnih snovi, je lahko potrebno določanje učinkov na mikrobno dejavnost v tleh, npr. kadar so potrebni podatki o potencialnih stranskih učinkih izdelkov za zaščito pridelka na talno mikrofloro ali kadar se pričakuje izpostavljenost mikroorganizmov kemikalijam, ki niso izdelki za zaščito pridelka. Preskus transformacije dušika se izvaja za določitev učinkov teh kemikalij na talno mikrofloro. Če se preskušajo agrokemikalije (npr. izdelki za zaščito pridelka, gnojila, gozdarske kemikalije), se izvedejo preskusi transformacije dušika in transformacije ogljika. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, zadošča preskus transformacije dušika. Če pa spadajo vrednosti preskusa transformacije dušika E_{50} za take kemikalije v izbor nitrifikacijskih inhibitorjev, ki so na voljo na tržišču (npr. nitrapirin), se lahko za pridobitev dodatnih informacij izvede preskus transformacije ogljika.

Tla so sestavljena iz živih in neživih sestavin, ki obstajajo v sestavljenih in heterogenih zmeseh. Mikroorganizmi imajo pomembno vlogo pri razgradnji in transformaciji organskih snovi v rodovitnih tleh in številne vrste prispevajo k različnim vidikom rodovitnosti tal. Vsaka dolgoročna motnja teh biokemičnih procesov lahko potencialno vpliva na kroženje hranilnih snovi, to pa lahko spremeni rodovitnost tal. Transformacija ogljika in dušika se pojavlja v vseh rodovitnih vrstah tal. Čeprav se mikrobne združbe, ki so odgovorne za te procese, razlikujejo od ene do druge vrste tal, so poti transformacije v bistvu enake.

Ta opisana preskusna metoda je namenjena odkrivanju dolgoročnih škodljivih učinkov snovi na proces transformacije dušika v aerobnih površinskih vrstah tal. Preskusna metoda omogoča tudi oceno učinkov snovi na transformacijo ogljika s talno mikrofloro. Nastajanje nitrata sledi razgradnji vezi med ogljikom in dušikom. Zato je, če so v tretiranih in kontrolnih tleh ugotovljene enake stopnje nastajanja nitrata, velika verjetnost, da so glavne poti razgradnje ogljika nedotaknjene in delujejo. Substrat, izbran za preskušanje (zdrob iz lucerne v prahu), ima ugodno razmerje ogljik-dušik (navadno med 12/1 in 16/1). Zato se pomanjkanje ogljika med preskusom zmanjša in če so mikrobne združbe zaradi kemikalije poškodovane, se lahko obnovijo v 100 dneh.

▼B

Preskusi, na katerih je bila razvita ta preskusna metoda, so bili prvenstveno namenjeni za snovi, pri katerih je mogoče predvideti količino, ki bo prišla v tla. Tak primer so izdelki za zaščito pridelka, pri katerih je stopnja uporabe na področju znana. Pri agrokemikalijah zadošča preskušanje dveh odmerkov, ki ustrezata pričakovani ali napovedani stopnji uporabe. Agrokemikalije se lahko preskušajo kot aktivne sestavine (a.i.) ali kot formulirani pripravki. Vendar preskus ni omejen na agrokemikalije. S spreminjanjem obojega, količine preskusne snovi, ki se uporabi v tleh, in načina vrednotenja podatkov, se lahko preskus uporabi tudi za kemikalije, pri katerih ni znana količina, ki naj bi prišla v tla. Tako se s kemikalijami, ki niso agrokemikalije, določijo učinki serije koncentracij pri transformaciji dušika. Podatki iz teh preskusov se uporabijo za pripravo krivulje odziva na odmerek in izračun vrednosti EC_x, kjer je x opredeljen % učinka.

1.2 OPREDELITVE POJMOV

Transformacija dušika: je dokončna razgradnja organske snovi, ki vsebuje dušik, z mikroorganizmi preko procesa amonifikacije in nitrifikacije do anorganskega končnega produkta nitrata.

EC_x (efektivna koncentracija): je koncentracija preskusne snovi v tleh, ki daje x-odstotno inhibicijo transformacije dušika v nitrat.

EC_{50} (srednja efektivna koncentracija): je koncentracija preskusne snovi v tleh, ki daje 50-odstotno (50 %) inhibicijo transformacije dušika v nitrat.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Presejana tla se dopolnijo z rastlinskim zdrobom v prahu in bodisi tretirajo s preskusno snovjo ali pustijo netretirana (kontrolna). Če se preskušajo agrokemikalije, se priporoča najmanj dve preskusni koncentraciji, izbereta pa se glede na največjo pričakovano koncentracijo na področju. Po 0, 7, 14 dnevih in 28 dnevih inkubacije se z ustreznim topilom ekstrahira vzorce tretiranih in kontrolnih tal in določi količina nitrata v ekstraktih. Stopnja nastajanja nitrata v tretiranih vzorcih se primerja s stopnjo v kontrolnih vzorcih in izračuna odstotek odklona tretiranih od kontrolnih. Vsi preskusi trajajo najmanj 28 dni. Če so 28. dan razlike med tretiranimi in netretiranimi tlemi enake ali večje od 25 %, se merjenje nadaljuje do največ 100 dni. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se v vzorce tal doda serija koncentracij preskusne snovi in po 28 dnevih inkubacije se izmerijo količine nitrata, ki nastane v tretiranih in kontrolnih vzorcih. Z regresijskim modelom se analizirajo rezultati preskusov z več koncentracijami in izračunajo vrednosti EC_x (to je EC_{50}, EC_{25} in/ali EC_{10}). Glej opredelitve pojmov.

1.5 VELJAVNOST PRESKUSA

Vrednotenje rezultatov preskusa z agrokemikalijami temelji na razmeroma majhnih razlikah (povprečna vrednost ± 25 %) med koncentracijami nitrata v kontrolnih in tretiranih vzorcih tal, tako da lahko velike razlike v kontrolah vodijo v napačne rezultate. Zato morajo biti razlike med ponovljenimi kontrolnimi vzorci manjše od ± 15 %.

▼B

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Naprave**

Za preskuse se uporabljajo posode iz kemijsko inertnega materiala. Imeti morajo ustrezno prostornino v skladu s postopkom, ki se uporablja za inkubacijo tal, se pravi za inkubacijo v razsutem stanju ali kot serija posameznih vzorcev tal (glej oddelek 1.7.1.2). Paziti je treba, da je med preskusom izguba vode čim manjša in da se omogoči izmenjava plinov (npr. posode za preskus so lahko pokrite s perforirano polietilensko folijo). Kadar se preskušajo hlapne snovi, je treba uporabiti zatesnjene, nepredušno zaprte posode. Te naj bodo take velikosti, da je približno ena četrtina prostornine napolnjena z vzorcem tal.

Uporablja se standardna laboratorijska oprema, ki vključuje:

— napravo za stresanje: mehanski mešalnik ali enakovredno opremo,

— centrifugo (3 000 g) ali napravo za filtriranje (z uporabo filtrirnega papirja, ki ne vsebuje nitrata),

— instrument za analizo nitrata z ustrezno občutljivostjo in ponovljivostjo.

1.6.2 **Izbira in število tal**

Uporabljajo se samo ena tla. Priporočene lastnosti tal so:

— vsebnost peska: ne manj kakor 50 % in ne več kakor 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— vsebnost organskega ogljika: 0,5–1,5 %,

— mikrobno biomaso je treba izmeriti (8) (9) in njena vsebnost ogljika naj bo vsaj 1 % skupnega organskega ogljika tal.

V večini primerov predstavljajo tla s temi lastnostmi najslabše možno stanje, ker je adsorpcija preskusne kemikalije najmanjša in razpoložljivost za mikrofloro največja. Zato navadno niso potrebni preskusi z drugimi vrstami tal. Kljub temu je lahko v nekaterih primerih, npr. kadar je glavni del pričakovane uporabe preskusne snovi v posebnih tleh, na primer kislih gozdnih, ali pri elektrostatično nabitih kemikalijah, potrebna uporaba dodatnih tal.

▼B

1.6.3 **Odvzemanje in shranjevanje vzorcev tal**

1.6.3.1 *Odvzemanje*

Na voljo morajo biti podrobne informacije o preteklosti mesta vzorčenja, kjer se odvzemajo tla za preskus. Podrobnosti vključujejo točno lokacijo, pokritost z vegetacijo, datume uporabe izdelkov za zaščito pridelka, uporabo organskih in anorganskih gnojil, dodatke bioloških materialov ali naključno kontaminacijo. Mesto, izbrano za odvzemanje tal, naj omogoča dolgotrajno uporabo. Primerni so trajni pašniki, polja z letnimi posevki žit (razen koruze) ali gosto posejanim zelenim gnojilom. Izbrano mesto vzorčenja najmanj eno leto pred jemanjem vzorcev ne sme biti tretirano z izdelki za zaščito pridelka. Tudi organska gnojila se ne smejo uporabljati najmanj šest mesecev. Sprejemljiva je samo uporaba mineralnega gnojila, kadar je v skladu z zahtevami posevka, vzorcev tal pa se ne sme vzeti še najmanj tri mesece po uporabi gnojila. Uporabi tal, tretiranih z gnojili, ki imajo znane biocidne učinke (npr. kalcijev cianamid), se je treba izogibati.

Vzorčenju se je treba izogibati med dolgimi obdobji (daljšimi od 30 dni) suše ali poplave in takoj po njih. Pri zoranih tleh se vzorci jemljejo iz globine od 0 do 20 cm globine. Pri travišč̌ih (pašnikih) ali drugih tleh, ki dolgo niso preorana (najmanj eno sezono), je največja globina vzorčenja lahko malo več kakor 20 cm (npr. do 25 cm).

Vzorce tal je treba prenašati v posodah in v temperaturnih razmerah, ki zagotavljajo, da se prvotne lastnosti tal bistveno ne spremenijo.

1.6.3.2 *Shranjevanje*

Najbolje je uporabiti tla, na sveže odvzeta na terenu. Če se shranjevanju v laboratoriju ne da izogniti, se lahko vzorci tal shranjujejo največ tri mesece v temi pri 4 ± 2 °C. Med shranjevanjem tal morajo biti zagotovljeni aerobni pogoji. Če se tla odvzemajo na območjih, ki so zamrznjena najmanj tri mesece na leto, je treba razmisliti o shranitvi za šest mesecev pri –18 °C do –22 °C. Mikrobna biomasa shranjenih tal se izmeri pred vsakim poskusom in ogljika v biomasi mora biti najmanj 1 % skupne vsebnosti organskega ogljika v tleh (glej oddelek 1.6.2).

1.6.4 **Ravnanje s tlemi in priprava na preskus**

1.6.4.1 *Predhodna inkubacija*

Če so bila tla shranjena (glej oddelek 1.6.3.2), se priporoča predhodna inkubacija za čas od 2 do 28 dni. Temperatura in vsebnost vlage tal med predhodno inkubacijo naj bosta podobni kakor med preskusom (glej oddelka 1.6.4.2 in 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Fizikalno-kemijske lastnosti*

Iz tal se ročno odstranijo večji objekti (npr. kamni, deli rastlin itd.), nato se vlažno presejejo brez odvečnega sušenja na velikost delcev, ki so manjši ali enaki 2 mm. Vsebnost vlage v vzorcu tal je treba prilagoditi z destilirano ali deionizirano vodo na vrednost med 40 % in 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode.

1.6.4.3 *Dopolnitev z organskim substratom*

Tla je treba dopolniti z ustreznim organskim substratom, npr. zdrobom iz travnato zelene lucerne v prahu (glavna sestavina: Medicago sativa) v razmerju C/N med 12/1 in 16/1. Priporočeno razmerje lucerna/tla je 5 g lucerne na kilogram tal (suha teža).

1.6.5 **Priprava preskusne snovi za aplikacijo na tla**

Preskusna snov se normalno uporablja z nosilcem. Nosilec je lahko voda (za snovi, topne v vodi) ali inertna trdna snov, kot je droben kremenov pesek (velikost delcev: 0,1–0,5 mm). Tekočih nosilcev, ki niso voda (npr. organska topila, kot sta aceton, kloroform), se je treba izogibati, ker lahko škodijo mikroflori. Če se kot nosilec uporablja pesek, se lahko prelije s preskusno snovjo, raztopljeno ali suspendirano v ustreznem topilu. V takih primerih je treba topilo pred mešanjem s tlemi odstraniti z izhlapevanjem. Za optimalno razporeditev preskusne snovi v tleh, se priporoča razmerje 10 g peska na kilogram tal (suhe teže). Kontrolni vzorci se tretirajo z enakovredno količino vode in/ali samo s kremenovim peskom.

Pri preskušanju hlapnih kemikalij se je treba, kolikor je mogoče, izogniti izgubam in poskusiti zagotoviti homogeno porazdelitev v tleh (npr. preskusno snov je treba vbrizgati v tla na več mestih).

1.6.6 **Preskusne koncentracije**

Če se preskušajo agrokemikalije, je treba uporabiti najmanj dve koncentraciji. Nižja koncentracija mora odražati najmanj največjo količino, za katero se pričakuje, da bi jo tla dosegla v praktičnih razmerah, višja koncentracija pa naj bo mnogokratnik nižje. Koncentracije preskusne snovi, dodane v tla, se izračunajo ob predpostavki enotne vključitve v globino 5 cm in gostote tal v razsutem stanju 1,5. Za agrokemikalije, ki se aplicirajo neposredno na tla ali za kemikalije, pri katerih je mogoče napovedati količino, ki pride v tla, so priporočene preskusne koncentracije največje predvidene koncentracije v okolju (PKO) in petkratniki te koncentracije. Snovi, za katere se pričakuje, da bodo v eni sezoni večkrat aplicirane na tla, je treba preskusiti pri koncentracijah, dobljenih z množenjem PKO z največjim pričakovanim številom aplikacij. Vendar zgornja preskušena koncentracija ne sme presegati desetkratnika največje posamične stopnje aplikacije. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se uporabi geometrična serija najmanj petih koncentracij. Preskušene koncentracije naj zajemajo razpon, ki je potreben za določitev vrednosti EC_x.

▼B

1.7 IZVEDBA PRESKUSA

1.7.1 **Pogoji izpostavljenosti**

1.7.1.1 *Tretiranje in kontrola*

Če se preskušajo agrokemikalije, se tla razdelijo v tri dele enake teže. Dva dela se zmešata z nosilcem, ki vsebuje proizvod, tretji pa se zmeša z nosilcem brez proizvoda (kontrola). Priporočajo se najmanj tri ponovitve s tretiranimi in netretiranimi tlemi. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se tla razdelijo v šest delov enake teže. Pet vzorcev se zmeša z nosilcem, ki vsebuje preskusno snov, in šesti vzorec se zmeša z nosilcem brez kemikalije. Priporočajo se po tri ponovitve za tretirane vzorce in kontrolo. Paziti je treba, da se zagotovi homogeno razporeditev preskusne snovi v tretiranih vzorcih tal. Med mešanjem se je treba izogibati stiskanju tal in nastajanju kep.

1.7.1.2 *Inkubacija vzorcev tal*

Inkubacija vzorcev tal se lahko izvede na dva načina: kot vzorci tretiranih in netretiranih tal v razsutem stanju ali kot serija posameznih podvzorcev vsakih tretiranih in netretiranih tal enake velikosti. Vendar pa se lahko, kadar se preskušajo hlapne snovi, preskus izvede samo s serijo posameznih podvzorcev tal. Kadar se tla inkubirajo v razsutem stanju, se pripravijo velike količine tretiranih in netretiranih tal, podvzorci za analizo pa se jemljejo po potrebi med preskusom. Količina, ki se na začetku pripravi za vsako tretiranje in kontrolo, je odvisna od velikosti podvzorcev, števila za analizo uporabljenih ponovitev in pričakovanega največjega števila ponovitev vzorčenja. Tla, inkubirana v razsutem stanju, je treba pred podvzorčenjem temeljito premešati. Kadar se tla inkubirajo kot serija posameznih vzorcev tal, se vsak vzorec tretiranih in netretiranih tal v razsutem stanju razdeli na zahtevano število podvzorcev in ti se uporabljajo po potrebi. Pri preskusih, kjer se lahko pričakuje več kakor dve vzorčenji, je treba pripraviti dovolj vzorcev, ob upoštevanju vseh ponovitev in vseh vzorčenj. Najmanj tri ponovitve vzorcev tal za preskus je treba inkubirati v aerobnih pogojih (glej oddelek 1.7.1.1). Pri vseh preskusih je treba uporabljati ustrezne posode z dovolj velikim volumnom nad vzorcem, da se prepreči razvoj anaerobnih pogojev. Vendar pa se lahko, kadar se preskušajo hlapne snovi, preskus izvede samo s serijo posameznih podvzorcev tal.

1.7.1.3 *Preskusni pogoji in trajanje*

Preskus se izvaja v temi pri sobni temperaturi 20 ± 2 °C. Vsebnost vlage v vzorcih tal se med preskusom vzdržuje med 40 % in 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode v tleh (glej oddelek 1.6.4.2) v razponu ± 5 %. Po potrebi se lahko doda destilirana, deionizirana voda.

Najkrajše trajanje preskusov je 28 dni. Če se preskušajo agrokemikalije, se primerjajo stopnje nastajanja nitrata v tretiranih in kontrolnih vzorcih. Če se te na 28. dan razlikujejo za več kakor 25 %, se preskus nadaljuje, dokler ni dosežena razlika, ki je enaka ali manjša od 25 % ali do največ 100 dni, kar je prej. Pri kemikalijah, ki niso agrokemikalije, se preskus prekine po 28 dneh. Na 28. dan se določijo količine nitrata v vzorcih tretiranih in kontrolnih tal in izračunajo vrednosti EC_x.

▼B

1.7.2 **Vzorčenje in analiza tal**

1.7.2.1 *Načrt za vzorčenje tal*

Če se preskušajo agrokemikalije, se vzorci tal 0., 7., 14. in 28. dan analizirajo na nitrat. Če se zahteva podaljšan preskus, je treba nadaljnje meritve opraviti v 14-dnevnih presledkih po 28. dnevu.

Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se uporabi najmanj pet preskusnih koncentracij, vzorci tal pa se analizirajo na nitrat na začetku (dan 0) in na koncu obdobja izpostavljenosti (28 dni). Če se zdi potrebno, se lahko doda še vmesno merjenje, npr. 7. dan. Podatki, dobljeni na 28. dan, se uporabljajo za določitev vrednosti EC_x za kemikalijo. Po želji se lahko podatki o kontrolnih vzorcih iz dneva 0 uporabijo za poročanje o začetni količini nitrata v tleh.

1.7.2.2 *Analiza vzorcev tal*

Količina nitrata, ki nastane v vsaki tretirani in kontrolni ponovitvi, se določi ob vsakem vzorčenju. Nitrat se ekstrahira iz tal s stresanjem vzorcev z ustreznim ekstrakcijskim topilom, npr. z 0,1 M raztopino kalijevega klorida. Priporoča se razmerje 5 ml raztopine KCl na gram suhe teže tal. Da bi optimizirali ekstrakcijo, posode, v katerih so vzorci tal in ekstrakcijska raztopina, ne smejo biti več kakor do polovice polne. Mešanice se 60 minut stresajo s 150 obrati na minuto. Zmesi se centrifugirajo ali filtrirajo in tekoče faze se analizirajo na nitrat. Tekoči ekstrakti brez delcev se lahko pred analizo shranijo pri minus 20 ± 5 °C za čas do šest mesecev.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Če so preskusi izvedeni z agrokemikalijami, je treba zabeležiti količino nitrata, nastalega v vsaki ponovitvi vzorca tal, in podati povprečne vrednosti vseh ponovitev v tabelarični obliki. Stopnje transformacije dušika se ovrednotijo z ustreznimi in splošno sprejetimi statističnimi metodami (npr. F-preskus, 5 % raven pomembnosti). Količine nastalega nitrata so izražene v mg nitrata/kg suhe teže tal/dan. Stopnja nastajanja nitrata pri vsakem tretiranju se primerja s kontrolo in izračuna odstotek odstopanja od kontrole.

Če so preskusi izvedeni s kemikalijami, ki niso agrokemikalije, se določi količina nitrata, ki nastane v vsaki ponovitvi in pripravi krivulja odziva na odmerek za oceno vrednosti EC_x. Količine nitrata (to je mg nitrata/kg suhe teže tal), ugotovljene v tretiranih vzorcih po 28 dneh se primerjajo s količinami, ugotovljenimi v kontroli. Iz teh podatkov se izračuna % vrednosti inhibicije za vsak preskus koncentracije. Ti odstotki se potem glede na koncentracijo in statistične postopke uporabijo za izračun vrednosti EC_x. Intervali zaupanja ($p = 0,95$) za izračunane EC_x so določeni tudi z uporabo standardnih postopkov (10) (11) (12).

Preskusne snovi, ki vsebujejo velike količine dušika, lahko prispevajo h količinam nitrata, ki nastanejo med preskusom. Če se te snovi preskusijo pri visoki koncentraciji (npr. kemikalije, za katere se pričakuje, da bodo uporabljene v ponovljenih aplikacijah), je v preskus treba vključiti ustrezne kontrole (to je tla plus preskusno snov, vendar brez rastlinskega zdroba). Podatki iz teh kontrol se morajo upoštevati pri izračunih EC_x.

▼B

2.2 RAZLAGA REZULTATOV

Kadar se ocenjujejo rezultati iz preskusov z agrokemikalijami in je razlika med stopnjami nastalih nitratov med nižjim tretiranjem (to je največjo predvideno koncentracijo) in kontrolo pri katerem koli vzorčenju po 28. dnevu enaka ali manjša od 25 %, se lahko oceni, da proizvod nima dolgoročnega vpliva na transformacijo dušika v tleh. Kadar se vrednotijo rezultati iz preskusov s kemikalijami, ki niso agrokemikalije, se uporabijo vrednosti EC_{50}, EC_{25} in/ali EC_{10}.

3 **POROČANJE**

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Popolna identifikacija uporabljenih tal, vključno z:

— geografsko oznako mesta (zemljepisno širino, zemljepisno dolžino),

— informacijami o preteklosti mesta preskusa (pokritost z vegetacijo, uporaba izdelkov za zaščito pridelkov, uporaba gnojil, naključna kontaminacija itd.),

— vrsto rabe (npr. kmetijsko zemljišče, gozd itd.),

— globino vzorčenja (cm),

— vsebnostjo peska/mulja/gline (% suhe teže),

— pH (v vodi),

— organsko vsebnostjo ogljika (% suhe teže),

— vsebnostjo dušika (% suhe teže),

— začetno koncentracijo nitrata (mg nitrata/kg suhe teže),

— kationsko izmenjalno kapaciteto (mmol/kg),

— mikrobno biomaso glede na odstotke skupnega organskega ogljika,

— sklici na metode, uporabljene za določanje posameznih parametrov,

— vsemi informacijami v zvezi z odvzemanjem in shranjevanjem vzorcev tal,

— podrobnostmi o predhodni inkubaciji tal, če je bila.

Preskusna snov:

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— kemijske identifikacijske podatke, kadar je ustrezno, vključno s strukturno formulo, čistostjo (odstotek aktivne sestavine v izdelkih za zaščito pridelka), vsebnostjo dušika.

Substrat:

— vir substrata,

— sestavo (zdrob iz lucerne, zdrob iz travnato zelene lucerne),

— vsebnost ogljika, dušika (% suhe teže),

— velikost presejanih delcev (mm).

▼B

Preskusni pogoji:

— podatke o dopolnitvi tal z organskim substratom,

— število koncentracij uporabljene preskusne kemikalije in, kadar je primerno, utemeljitev izbranih koncentracij,

— podatke o aplikaciji preskusne snovi na tla,

— inkubacijsko temperaturo,

— vsebnost vlage v tleh na začetku preskusa in med njim,

— uporabljeno metodo inkubacije tal (v razsutem stanju ali kot serija posameznih podvzorcev),

— število ponovitev,

— število vzorčenj,

— uporabljeno metodo za ekstrakcijo nitrata iz tal.

Rezultati:

— analitični postopek in opremo, uporabljeno za analizo nitrata,

— tabelarične podatke, vključno s posameznimi in srednjimi vrednostmi meritev nitrata,

— razliko med ponovitvami s tretiranimi in kontrolnimi vzorci,

— razlage popravkov izračunov, če je ustrezno,

— odstotek razlik v stopnjah nastajanja nitrata pri vsakem vzorčenju ali, če je primerno, vrednost EC_{50} s 95-odstotno mejo zaupanja, drugo EC_x (EC_{25} ali EC_{10}) z intervalom zaupanja in graf krivulje odziva na odmerek,

— statistično obdelavo rezultatov,

— vse informacije in opažanja, koristne za razlago rezultatov preskusa.

4. **LITERATURA**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SET AC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22 TALNI MIKROORGANIZMI: PRESKUS TRANSFORMACIJE OGLJIKA

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 217 (2000).

1.1 UVOD

Ta preskusna metoda opisuje laboratorijsko metodo, namenjeno raziskovanju potencialnih dolgoročnih učinkov enkratne izpostavljenosti izdelkov za zaščito pridelka in morebitnih drugih kemikalij na dejavnost talnih mikroorganizmov pri transformaciji ogljika. Preskus načeloma temelji na priporočilih Evropske in sredozemske organizacije za varstvo rastlin (1). Vendar so bile upoštevane tudi druge smernice, na primer smernice Nemškega zveznega zavoda za biologijo (2), Ameriške agencije za varstvo okolja (3) in SET AC (4). Na delavnici OECD o izbiri tal/usedline, ki je bila leta 1995 v Belgiratu v Italiji (5), je bil dosežen dogovor o številu in vrstah tal za uporabo v tem preskusu. Priporočila za odvzemanje, obravnavanje in shranjevanje vzorcev tal temeljijo na napotkih ISO (6) in priporočilih delavnice iz Belgirata.

Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih lastnosti preskusnih snovi, je lahko potrebno določanje učinkov na mikrobno dejavnost v tleh, npr. kadar so potrebni podatki o potencialnih stranskih učinkih izdelkov za zaščito pridelka na talno mikrofloro ali kadar se pričakuje izpostavljenost mikroorganizmov kemikalijam, ki niso izdelki za zaščito pridelka. Preskus transformacije ogljika se izvaja za določitev učinkov teh kemikalij na talno mikrofloro. Če se preskušajo agrokemikalije (npr. izdelki za zaščito pridelka, gnojila, gozdarske kemikalije), se izvedejo preskusi transformacije ogljika in transformacije dušika. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, zadošča preskus transformacije dušika. Če pa spadajo vrednosti preskusa transformacije dušika E_{50} za take kemikalije v izbor nitrifikacijskih inhibitorjev, ki so na voljo na tržišču (npr. nitrapirin), se lahko preskus transformacije ogljika izvede za pridobitev dodatnih informacij.

Tla so sestavljena iz živih in neživih sestavin, ki obstajajo v sestavljenih in heterogenih zmeseh. Mikroorganizmi imajo pomembno vlogo pri razgradnji in transformaciji organskih snovi v rodovitnih tleh in številne vrste prispevajo k različnim vidikom rodovitnosti tal. Vsaka dolgoročna motnja teh biokemičnih procesov lahko potencialno vpliva na kroženje hranilnih snovi, to pa lahko spremeni rodovitnost tal. Transformacija ogljika in dušika se pojavlja v vseh rodovitnih vrstah tal. Čeprav se mikrobne združbe, ki so odgovorne za te procese, razlikujejo od ene do druge vrste tal, so poti transformacije v bistvu enake.

▼B

Ta preskusna metoda je namenjena odkrivanju dolgoročnih škodljivih učinkov snovi na proces transformacije ogljika v aerobnih površinskih vrstah tal. Preskus je občutljiv na spremembe velikosti in dejavnosti mikrobnih združb, ki so odgovorne za transformacijo ogljika, ker so te združbe odvisne od poudarjene kemikalije in pomanjkanja ogljika. Uporabijo se peščena tla z malo organskih snovi. Ta tla se tretirajo s preskusno snovjo in inkubirajo v pogojih, ki omogočajo hitro mikrobiološko presnovo. V teh pogojih se viri razpoložljivega ogljika v tleh hitro praznijo. To povzroča pomanjkanje ogljika, ki ubija mikrobne celice in povzroča mrtvilo in/ali spomlacijo. Če teče preskus več kakor 28 dni, se lahko vsota teh reakcij izmeri v kontrolah (netretiranih tleh) kot progresivna izguba presnovno aktivne mikrobne biomase (7). Če je biomasa v tleh s poudarjenim ogljikom v teh pogojih preskusa prizadeta zaradi navzočnosti kemikalije, se morda ne vrne na enako raven kot kontrola. Zato motnje, ki jih povzroči preskusna snov kadar koli med preskusom, pogosto trajajo do konca preskusa.

Preskusi, na katerih je bila razvita ta preskusna metoda, so bili prvenstveno namenjeni za snovi, pri katerih je mogoče predvideti količino, ki bo prišla v tla. Tak primer so izdelki za zaščito pridelka, pri katerih je stopnja uporabe na področju znana. Pri agrokemikalijah zadošča preskušanje dveh odmerkov, ki ustrezata pričakovani ali napovedani stopnji uporabe. Agrokemikalije se lahko preskušajo kot aktivne sestavine (a.i.) ali kot formulirani pripravki. Vendar preskus ni omejen na kemikalije s predvidenimi koncentracijami v okolju. S spreminjanjem obojega, količine preskusne snovi, ki se uporabi v tleh, in načina vrednotenja podatkov, se lahko preskus uporabi tudi za kemikalije, pri katerih ni znana količina, ki naj bi prišla v tla. Tako se s kemikalijami, ki niso agrokemikalije, določijo učinki serije koncentracij pri transformaciji ogljika. Podatki iz teh preskusov se uporabijo za pripravo krivulje odziva na odmerek in izračun vrednosti EC_x, kjer je x opredeljen % učinka.

1.2 OPREDELITVE POJMOV

Transformacija ogljika: je razgradnja organske snovi z mikroorganizmi, pri kateri nastane anorganski končni produkt ogljikov dioksid.

EC_x (efektivna koncentracija): je koncentracija preskusne snovi v tleh, ki daje x-odstotno inhibicijo transformacije ogljika v ogljikov dioksid.

EC_{50} (srednja efektivna koncentracija): je koncentracija preskusne snovi v tleh, ki daje 50-odstotno inhibicijo transformacije ogljika v ogljikov dioksid.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Jih ni.

▼B

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Presejana tla se bodisi tretirajo s preskusno snovjo ali pustijo netretirana (kontrolna). Če se preskušajo agrokemikalije, se priporoča najmanj dve preskusni koncentraciji, izbereta pa se glede na največjo pričakovano koncentracijo na področju. Po 0, 7, 14 dnevih in 28 dnevih inkubacije se tretirane in kontrolne vzorce tal pomeša z glukozo, stopnje respiracije, ki jo povzroči glukoza, pa se merijo 12 zaporednih ur. Stopnje respiracije so izražene kot sproščeni ogljikov dioksid (mg ogljikovega dioksida/kg suhih tal/uro) ali kot porabljeni kisik (mg kisika/kg tal/uro). Povprečna stopnja respiracije v vzorcih tretiranih tal se primerja s stopnjo v kontrolni in se izračuna odstotek odstopanja tretiranih tal od kontrolnih. Vsi preskusi trajajo najmanj 28 dni. Če so 28. dan razlike med tretiranimi in netretiranimi tlemi enake ali večje od 25 %, se merjenje v 14-dnevnih presledkih nadaljuje do največ 100 dni. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se v vzorce tal doda serija koncentracij preskusne snovi in po 28 dnevih se izmerijo stopnje respiracije, ki jih povzroči glukoza (to je povprečna količina nastalega ogljikovega dioksida ali porabljenega kisika). Z regresijskim modelom se analizirajo rezultati preskusov s serijo koncentracij in izračunajo vrednosti EC_x (to je EC_{50}, EC_{25} in/ali EC_{10}). Glej opredelitve pojmov.

1.5 VELJAVNOST PRESKUSA

Vrednotenje rezultatov preskusa z agrokemikalijami temelji na razmeroma majhnih razlikah (povprečna vrednost ± 25 %) med sproščenim ogljikovim dioksidom in porabljenim kisikom v kontrolnih in tretiranih vzorcih tal, tako da lahko velike razlike v kontrolah vodijo v napačne rezultate. Zato morajo biti razlike med ponovljenimi kontrolnimi vzorci manjše od ± 15 %.

1.6 OPIS PRESKUSNE METODE

1.6.1 **Naprave**

Za preskuse se uporabljajo posode iz kemijsko inertnega materiala. Imeti morajo ustrezno prostornino v skladu s postopkom, ki se uporablja za inkubacijo tal, se pravi za inkubacijo v razsutem stanju ali kot serija posameznih vzorcev tal (glej oddelek 1.7.1.2). Paziti je treba, da je med preskusom izguba vode čim manjša in da se omogoči izmenjava plinov (npr. posode za preskus so lahko pokrite s perforirano polietilensko folijo). Kadar se preskušajo hlapne snovi, je treba uporabiti zatesnjene, nepredušno zaprte posode. Te naj bodo take velikosti, da je približno ena četrtina prostornine napolnjena z vzorcem tal.

Za določitev respiracije, ki jo povzroči glukoza, so potrebni inkubacijski sistemi in instrumenti za merjenje produkcije ogljikovega dioksida ali porabe kisika. Primeri takih sistemov in instrumentov so v literaturi (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Izbira in število tal**

Uporabljajo se samo ena tla. Priporočene lastnosti tal so:

— vsebnost peska: ne manj kakor 50 % in ne več kakor 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— vsebnost organskega ogljika: 0,5–1,5 %,

— mikrobno biomaso je treba izmeriti (12) (13) in njena vsebnost ogljika naj bo vsaj 1 % skupnega organskega ogljika tal.

V večini primerov predstavljajo tla s temi lastnostmi najslabše možno stanje, ker je adsorpcija preskusne kemikalije najmanjša in razpoložljivost za mikrofloro največja. Zato navadno niso potrebni preskusi z drugimi vrstami tal. Kljub temu je lahko v nekaterih primerih, npr. kadar je glavni del pričakovane uporabe preskusne snovi v posebnih tleh, na primer kislih gozdnih tleh, ali pri elektrostatično nabitih kemikalijah, treba nadomestiti dodatna tla.

1.6.3 **Odvzemanje in shranjevanje vzorcev tal**

1.6.3.1 *Odvzemanje*

Na voljo morajo biti podrobne informacije o preteklosti mesta vzorčenja, kjer se odvzemajo tla za preskus. Podrobnosti vključujejo točno lokacijo, pokritost z vegetacijo, datume uporabe izdelkov za zaščito pridelka, uporabo organskih in anorganskih gnojil, dodatke bioloških materialov ali naključno kontaminacijo. Mesto, izbrano za odvzemanje tal, naj omogoča dolgotrajno uporabo. Primerni so trajni pašniki, polja z letnimi posevki žit (razen koruze) ali gosto posejanim zelenim gnojilom. Izbrano mesto vzorčenja ne sme biti tretirano z izdelki za zaščito pridelka najmanj eno leto pred jemanjem vzorcev. Tudi organska gnojila se ne smejo uporabljati najmanj šest mesecev. Sprejemljiva je samo uporaba mineralnega gnojila, kadar je v skladu z zahtevami posevka, vzorcev tal pa se ne sme vzeti še najmanj tri mesece po uporabi gnojila. Uporabi tal, tretiranih z gnojili, ki imajo znane biocidne učinke (npr. kalcijev cianamid), se je treba izogibati.

Vzorčenju se je treba izogibati med dolgimi obdobji (daljšimi od 30 dni) suše ali poplave in takoj po njih. Pri zoranih tleh se vzorci jemljejo iz globine od 0 do 20 cm globine. Pri travišč̌ih (pašnikih) ali drugih tleh, ki dolgo niso preorana (najmanj eno sezono), je največja globina vzorčenja lahko malo več kakor 20 cm (npr. do 25 cm). Vzorce tal je treba prenašati v posodah in v temperaturnih razmerah, ki zagotavljajo, da se prvotne lastnosti tal bistveno ne spremenijo.

1.6.3.2 *Shranjevanje*

Najbolje je uporabiti tla, na sveže odvzeta na terenu. Če se shranjevanju v laboratoriju ne da izogniti, se lahko vzorec tal shranjuje največ tri mesece v temi pri 4 ± 2 °C. Med shranjevanjem tal morajo biti zagotovljeni aerobni pogoji. Če se tla odvzamejo na območjih, ki so zamrznjena najmanj tri mesece na leto, je treba razmisliti o shranitvi za šest mesecev pri –18 °C do –22 °C. Mikrobna biomasa shranjenih tal se izmeri pred vsakim poskusom in ogljika v biomasi mora biti najmanj 1 % skupne vsebnosti organskega ogljika v tleh (glej oddelek 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Ravnanje s tlemi in priprava na preskus**

1.6.4.1 *Predhodna inkubacija*

Če so bila tla shranjena (glej oddelka 1.6.4.2 in 1.7.1.3), se priporoča predhodna inkubacija za čas od 2 do 28 dni. Temperatura in vsebnost vlage tal med predhodno inkubacijo naj bosta podobni kakor med preskusom (glej oddelka 1.6.4.2 and 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fizikalno-kemijske lastnosti*

Iz tal se ročno odstranijo večji objekti (npr. kamni, deli rastlin itd.), nato se vlažno presejejo brez odvečnega sušenja na velikost delcev, ki so manjši ali enaki 2 mm. Vsebnost vlage v vzorcu tal je treba prilagoditi z destilirano ali deionizirano vodo na vrednost med 40 % in 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode.

1.6.5 **Priprava preskusne snovi za aplikacijo na tla**

Preskusna snov se normalno uporablja z nosilcem. Nosilec je lahko voda (za snovi, topne v vodi) ali inertna trdna snov, kot je droben kremenov pesek (velikost delcev: 0,1–0,5 mm). Tekočih nosilcev, ki niso voda (npr. organska topila, kot sta aceton, kloroform), se je treba izogibati, ker lahko škodijo mikroflori. Če se kot nosilec uporablja pesek, se lahko prelije s preskusno snovjo, raztopljeno ali suspendirano v ustreznem topilu. V takih primerih je treba topilo pred mešanjem s tlemi odstraniti z izhlapevanjem. Za optimalno razporeditev preskusne snovi v tleh, se priporoča razmerje 10 g peska na kilogram tal (suhe teže). Kontrolni vzorci se tretirajo z enakovredno količino vode in/ali samo s kremenovim peskom.

Pri preskušanju hlapnih kemikalij se je treba izogibati izgubam in poskusiti zagotoviti homogeno porazdelitev v tleh (npr. preskusno snov je treba vbrizgati v tla na več mestih).

1.6.6 **Preskusne koncentracije**

Če se preskušajo izdelki za zaščito pridelka ali druge kemikalije s predvidenimi koncentracijami v okolju, je treba uporabiti najmanj dve koncentraciji. Nižja koncentracija mora odražati najmanj največjo količino, za katero se pričakuje, da bi jo tla dosegla v praktičnih razmerah, višja koncentracija pa naj bo mnogokratnik nižje. Koncentracije preskusne snovi, dodane v tla, se izračunajo ob predpostavki enotne vključitve v globino 5 cm in gostote tal v razsutem stanju 1,5. Za agrokemikalije, ki se aplicirajo neposredno na tla ali za kemikalije, pri katerih je mogoče napovedati količino, ki pride v tla, so priporočene najvišje preskusne koncentracije predvidenih koncentracij v okolju (PKO) in petkratniki te koncentracije. Snovi, za katere se pričakuje, da bodo v eni sezoni večkrat aplicirane na tla, je treba preskusiti pri koncentracijah, dobljenih z množenjem PKO z največjim pričakovanim številom aplikacij. Vendar zgornja preskušena koncentracija ne sme presegati desetkratnika največje posamične stopnje aplikacije.

Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se uporabi geometrična serija najmanj petih koncentracij. Preskušene koncentracije naj zajemajo razpon, ki je potreben za določitev vrednosti EC_x.

▼B

1.7 IZVEDBA PRESKUSA

1.7.1 **Pogoji izpostavljenosti**

1.7.1.1 *Tretiranje in kontrola*

Če se preskušajo agrokemikalije, se tla razdelijo v tri dele enake teže. Dva dela se zmešata z nosilcem, ki vsebuje proizvod, tretji pa se zmeša z nosilcem brez proizvoda (kontrola). Priporočajo se najmanj tri ponovitve s tretiranimi in netretiranimi tlemi. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se tla razdelijo v šest delov enake teže. Pet vzorcev se zmeša z nosilcem, ki vsebuje preskusno snov, in šesti vzorec se zmeša z nosilcem brez kemikalije. Priporočajo se po tri ponovitve za tretirane vzorce in kontrolo. Paziti je treba, da se zagotovi homogeno razporeditev preskusne snovi v tretiranih vzorcih tal. Med mešanjem se je treba izogibati stiskanju tal in nastajanju kep.

1.7.1.2 *Inkubacija vzorcev tal*

Inkubacija vzorcev tal se lahko izvede na dva načina: kot vzorci tretiranih in netretiranih tal v razsutem stanju ali kot serija posameznih podvzorcev vsakih tretiranih in netretiranih tal enake velikosti. Vendar pa se lahko, kadar se preskušajo hlapne snovi, preskus izvede samo s serijo posameznih podvzorcev tal. Kadar se tla inkubirajo v razsutem stanju, se pripravijo velike količine tretiranih in netretiranih tal, podvzorci za analizo pa se jemljejo po potrebi med preskusom. Količina, ki se na začetku pripravi za vsako tretiranje in kontrolo, je odvisna od velikosti podvzorcev, števila za analizo uporabljenih ponovitev in pričakovanega največjega števila ponovitev vzorčenja. Tla, inkubirana v razsutem stanju, je treba pred podvzorčenjem temeljito premešati. Kadar se tla inkubirajo kot serija posameznih vzorcev tal, se vsak vzorec tretiranih in netretiranih tal v razsutem stanju razdeli na zahtevano število podvzorcev in ti se izkoriščajo po potrebi. Pri preskusih, kjer se lahko pričakuje več kakor dve vzorčenji, je treba pripraviti dovolj vzorcev, ob upoštevanju vseh ponovitev in vseh vzorčenj. Najmanj tri ponovitve vzorcev tal za preskus je treba inkubirati v aerobnih pogojih (glej oddelek 1.7.1.1). Pri vseh preskusih je treba uporabljati ustrezne posode z dovolj velikim volumnom nad vzorcem, da se prepreči razvoj anaerobnih pogojev. Vendar pa se lahko, kadar se preskušajo hlapne snovi, preskus izvede samo s serijo posameznih podvzorcev tal.

1.7.1.3 *Preskusni pogoji in trajanje*

Preskus se izvaja v temi pri sobni temperaturi 20 ± 2 °C. Vsebnost vlage v vzorcih tal se med preskusom vzdržuje med 40 % in 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode v tleh (glej oddelek 1.6.4.2) v razponu ± 5 %. Po potrebi se lahko doda destilirana, deionizirana voda.

Najkrajše trajanje preskusov je 28 dni. Če se preskušajo agrokemikalije, se primerjajo količine sproščenega ogljikovega dioksida ali porabljenega kisika v tretiranih in kontrolnih vzorcih. Če se te na 28. dan razlikujejo za več kakor 25 %, se preskus nadaljuje, dokler ni dosežena razlika, ki je enaka ali manjša od 25 % ali do največ 100 dni, kar je prej. Če se preskušajo kemikalije, ki niso agrokemikalije, se preskus prekine po 28 dneh. Na 28. dan se določijo količine sproščenega ogljikovega dioksida ali porabljenega kisika v vzorcih tretiranih in kontrolnih tal in izračunajo vrednosti EC_x.

▼B

1.7.2 **Vzorčenje in analiza tal**

1.7.2.1 *Načrt za vzorčenje tal*

Če se preskušajo agrokemikalije, se vzorci tal na 0., 7., 14. in 28. dan analizirajo glede stopnje respiracije, ki jo povzroča glukoza. Če je potreben podaljšan preskus, se nadaljnje meritve opravijo v 14-dnevnih presledkih po 28. dnevu.

Če se preskušajo kemijalije, ki niso agrokemikalije, se uporabi in analizira vsaj pet preskusnih koncentracij in vzorcev tal glede respiracije, ki jo povzroči glukoza, na začetku (dan 0) in na koncu obdobja izpostavljenosti (28 dni). Če se zdi potrebno, se lahko doda še vmesno merjenje, npr. 7. dan. Podatki, dobljeni na 28. dan, se uporabljajo za določitev vrednosti EC_x za kemikalijo. Po potrebi se lahko podatki o kontrolnih vzorcih iz dneva 0 uporabijo za oceno začetnih količin presnovno dejavne mikrobne biomase v tleh (12).

1.7.2.2 *Merjenje stopenj respiracije, ki jo povzroči glukoza*

Stopnja respiracije, ki jo povzroči glukoza v vsaki tretirani in kontrolni ponovitvi, se določi ob vsakem vzorčenju. Vzorci tal se pomešajo z zadostno količino glukoze, da izzove takojšnji največji odziv respiracije. Količina glukoze, ki je potrebna za sprožanje največjega respiratornega odziva iz danih tal, se lahko določi s predhodnim preskusom s serijo koncentracij glukoze (14). Vendar za peščena tla z 0,5–1,5 % organskega ogljika navadno zadošča 2 000 mg do 4 000 mg glukoze na kg suhe teže tal. Glukoza se lahko zmelje v prah s čistim kremenovim peskom (10 g peska/kg suhe teže tal) in homogeno pomeša s tlemi.

Vzorci tal, dopolnjeni z glukozo, se inkubirajo v primerni napravi za merjenje stopenj respiracije, bodisi neprekinjeno, vsako uro ali vsaki dve uri (glej oddelek 1.6.1) pri 20 ± 2 °C. Sproščeni ogljikov dioksid ali porabljeni kisik se meri 12 zaporednih ur in meritve se morajo začeti čim prej, to je 1 ali 2 uri po dopolnitvi z glukozo. Izmeri se skupna količina sproščenega ogljikovega dioksida ali porabljenega kisika v 12 urah in določi srednja stopnja respiracije.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Če se preskušajo agrokemikalije, je treba zabeležiti sproščeni ogljikov dioksid ali porabljeni kisik v vsakem ponovljenem vzorcu tal in v tabelarični obliki podati povprečne vrednosti vseh ponovitev. Rezultati se ovrednotijo z ustreznimi in splošno sprejetimi statističnimi metodami (npr. F-preskus, 5 % raven pomembnosti). Stopnje respiracije, ki jo povzroči glukoza, so izražene v mg ogljikovega dioksida/kg suhe teže tal/uro ali mg kisika/suho težo tal/uro. Povprečna stopnja nastajanja ogljikovega dioksida ali povprečna stopnja porabe kisika v vsakem tretiranem vzorcu se primerja s stopnjo porabe v kontroli in izračuna odstotek odstopanja od kontrole.

▼B

Če so preskusi izvedeni s kemikalijami, ki niso agrokemikalije, se določi količina sproščenega ogljikovega dioksida ali porabljenega kisika v vsaki ponovitvi in pripravi krivulja odziva na odmerek za oceno vrednosti EC_x. Stopnje respiracije, ki jih povzroči glukoza (to je mg ogljikovega dioksida/kg suhe teže tal/uro ali mg kisika/suho težo tal/uro), ugotovljene v tretiranih vzorcih po 28 dnevih, se primerjajo s tistimi, ki so ugotovljene v kontroli. Iz teh podatkov se izračuna % vrednosti inhibicije za vsak preskus koncentracije. Ti odstotki se glede na koncentracijo in statistične postopke uporabijo za izračun vrednosti EC_x. Intervali zaupanja ($p = 0,95$) za izračunane EC_x so določeni tudi z uporabo standardnih postopkov (15) (16) (17).

2.2 RAZLAGA REZULTATOV

Kadar se ocenjujejo rezultati iz preskusov z agrokemikalijami in je razlika med stopnjami respiracije med nižjim tretiranjem (to je največjo predvideno koncentracijo) in kontrolo pri katerem koli vzorčenju po 28. dnevu enaka ali manjša od 25 %, se lahko oceni, da proizvod nima dolgoročnega vpliva na transformacijo ogljika v tleh. Kadar se vrednotijo rezultati iz preskusov s kemikalijami, ki niso agrokemikalije, se uporabijo vrednosti EC_{50}, EC_{25} in/ali EC_{10}.

3 **POROČANJE**

POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Popolna identifikacija uporabljenih tal, vključno z:

— geografsko oznako mesta (zemljepisno širino, zemljepisno dolžino),

— informacijami o preteklosti mesta preskusa (pokritost z vegetacijo, uporaba izdelkov za zaščito pridelkov, uporaba gnojil, naključna kontaminacija itd.),

— vrsto rabe (npr. kmetijsko zemljišče, gozd itd.),

— globino vzorčenja (cm),

— vsebnostjo peska/mulja/gline (% suhe teže),

— pH (v vodi),

— organsko vsebnostjo ogljika (% suhe teže),

— vsebnostjo dušika (% suhe teže),

— kationsko izmenjalno kapaciteto (mmol/kg),

— začetno mikrobno biomaso glede na odstotke skupnega organskega ogljika,

— sklici na metode, uporabljene za določanje posameznih parametrov,

— vsemi informacijami v zvezi z odvzemanjem in shranjevanjem vzorcev tal,

— podrobnostmi o predhodni inkubaciji tal, če je bila.

▼B

Preskusna snov:

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— kemijske identifikacijske podatke, kadar je ustrezno, vključno s strukturno formulo, čistostjo (odstotek aktivne sestavine v izdelkih za zaščito pridelka), vsebnostjo dušika.

Preskusni pogoji:

— podatke o dopolnitvi tal z organskim substratom,

— število koncentracij uporabljene preskusne kemikalije in, kadar je primerno, utemeljitev izbranih koncentracij,

— podatke o aplikaciji preskusne snovi na tla,

— inkubacijsko temperaturo,

— vsebnost vlage v tleh na začetku preskusa in med njim,

— uporabljeno metodo inkubacije tal (v razsutem stanju ali kot serija posameznih podvzorcev),

— število ponovitev,

— število vzorčenj.

Rezultati:

— metodo in opremo, uporabljeno za merjenje stopenj respiracije,

— tabelarične podatke, vključno s posameznimi in srednjimi vrednostmi količin ogljikovega dioksida ali kisika,

— razliko med ponovitvami s tretiranimi in kontrolnimi vzorci,

— razlage popravkov izračunov, če je ustrezno,

— odstotek razlik v stopnjah respiracije, povzročene z glukozo, pri vsakem vzorčenju ali, če je primerno, vrednost EC_{50} s 95 odstotno mejo zaupanja, drugo EC_x (EC_{25} ali EC_{10}) z intervalom zaupanja in graf krivulje odziva na odmerek,

— statistično obdelavo rezultatov, po potrebi,

— vse informacije in opažanja, koristne za razlago rezultatov preskusa.

4. **LITERATURA**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Pl ant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45–60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831–871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77–81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegeniiber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113–120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23 **AEROBNA IN ANAEROBNA TRANSFORMACIJA V TLEH**

1. **METODA**

Ta preskusna metoda ustreza metodi OECD TG 307 (2002).

1.1 UVOD

Ta preskusna metoda temelji na obstoječih smernicah (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Metoda, opisana v tej preskusni metodi, je namenjena ovrednotenju aerobne in anaerobne transformacije kemikalij v tleh. Izvajajo se poskusi za določitev (i) stopnje transformacije preskusne snovi in (ii) narave in stopenj nastajanja in zmanjševanja produktov transformacije, ki so jim lahko izpostavljene rastline in talni organizmi. Take študije so potrebne za kemikalije, ki se nanašajo neposredno na tla ali za katere je verjetno, da bodo prišle v talno okolje. Rezultati teh laboratorijskih študij se lahko uporabijo tudi za razvoj protokolov vzorčenja in analiz za študije na sorodnih področjih.

Aerobne in anaerobne študije z eno vrsto tal navadno zadoščajo za ovrednotenje poti transformacije (8) (10) (11). Stopnje transformacije je treba določiti še v najmanj treh dodatnih vzorcih tal (8) (10).

Na delavnici OECD o izbiri tal/usedline, ki je bila leta 1995 v Belgiratu v Italiji (10), je bil dosežen dogovor predvsem o številu in vrstah tal za uporabo v tem preskusu. Vrste preskušanih tal morajo biti reprezentativne za okoljske razmere, kjer se bo pojavila uporaba ali sproščanje. Na primer kemikalije, ki se lahko sproščajo v subtropskih do tropskih podnebjih, se morajo preskušati na ferasolih ali nitosolih (sistem FAO). Na delavnici so bila dana tudi priporočila v zvezi z odvzemanjem, obravnavanjem in shranjevanjem vzorcev tal, ki temeljijo na napotkih ISO (15). Ta metoda obravnava tudi uporabo riževih (namakalnih, poplavljenih) tal.

1.2 OPREDELITVE POJMOV

Preskusna snov: katera koli snov, bodisi osnovna zmes ali ustrezni produkti transformacije.

Produkti transformacije: vse snovi, ki so posledica biotskih ali abiotskih transformacijskih reakcij preskusne snovi, vključno s CO_2 in produkti, ki so v vezanih ostankih.

Vezani ostanki: „vezani ostanki“ predstavljajo spojine v tleh, rastlinske ali živalske, ki vztrajajo v matrici v obliki osnovne snovi ali njenega(ih) metabolita(ov)/produktov transformacije po ekstrakciji. Ekstrakcijska metoda ne sme bistveno spremeniti samih spojin ali strukture matrice. Narava vezi se lahko delno pojasni z ekstrakcijskimi metodami, ki spreminjajo matrico, in z visoko razvitimi analitskimi tehnikami. Do sedaj so bile, na primer, na ta način odkrite kovalentne ionske in sorptivne vezi. Na splošno nastajanje vezanih ostankov znatno zmanjša biološko dostopnost in biološko razpoložljivost (12) (prikrojeno po IUPAC-u 1984 (13)).

Aerobna transformacija: reakcije, ki se pojavljajo v navzočnosti molekularnega kisika (14).

▼B

Anaerobna transformacija: reakcije, ki se pojavljajo v odsotnosti molekularnega kisika (14).

Tla: so mešanica mineralnih in organskih kemičnih sestavin, slednje vsebujejo spojine z visoko vsebnostjo ogljika in dušika in z veliko molsko maso, ki jih poživljajo majhni (večinoma mikro-) organizmi. Tla se lahko obdelujejo v dveh stanjih:

(a) v neoviranem, kakor so se razvila s časom, z značilnimi plastmi različnih vrst tal;

(b) oviranem, kakor jih navadno najdemo na ornih zemljiščih ali kakor se pojavljajo, kadar se vzorci jemljejo s kopanjem in se uporablja ta preskusna metoda (14).

Mineralizacija: je popolna razgradnja organske spojine v CO_2 in H_2O v aerobnih razmerah in CH_4, CO_2 in H_2O v anaerobnih razmerah. V smislu te preskusne metode, kjer se uporablja spojina z oznako ^{14}C, mineralizacija pomeni obsežno razgradnjo, v kateri se označen ogljikov atom oksidira s sproščanjem ustrezne količine $^{14}CO_2$ (14).

Razpolovna doba: $t_{0,5}$ je čas, potreben za 50 %-no transformacijo preskusne snovi, kadar lahko transformacijo opišemo kot kinetiko prvega reda; razpolovna doba ni odvisna od koncentracije.

Čas razgradnje DT_{50}: je čas, v katerem se koncentracija preskusne snovi zmanjša za 50 %; je drugačen od razpolovne dobe $t_{0,5}$, ko transformacija ne sledi kinetiki prvega reda.

Čas razgradnje DT_{75}: je čas, v katerem se koncentracija preskusne snovi zmanjša za 75 %.

Čas razgradnje DT_{90}: je čas, v katerem se koncentracija preskusne snovi zmanjša za 90 %.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčne snovi se uporabljajo za opis in/ali določitev produktov transformacije s spektroskopsko in kromatografsko metodo.

1.4 UPORABNOST PRESKUSA

Metoda se uporablja za vse kemijske snovi (brez oznake ali z radioaktivno oznako), za katere je na voljo dovolj natančna in občutljiva analitska metoda. Uporablja se za rahlo hlapne, nehlapne, vodotopne ali v vodi netopne spojine. Preskus naj se ne uporablja za kemikalije v tleh, ki so lahko hlapne (npr. fumiganti, organska topila) in se tako ne morejo zadrževati v tleh za poskusne pogoje tega preskusa.

▼B

1.5 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

Za merjenje stopnje transformacije se lahko uporabi neoznačena ali označena preskusna snov. Označeni material je potreben za preučevanje poti transformacije in za vzpostavitev masne bilance. Priporoča se oznaka ^{14}C, vendar je lahko koristna tudi uporaba drugih izotopov, na primer C, N, H, P. Če je to mogoče, naj se oznaka namesti na najstabilnejši del(e) molekule ([1]). Čistost preskusne snovi naj bo vsaj 95 %.

Pred izvajanjem preskusa o aerobni in anaerobni transformaciji v tleh, naj bodo na voljo naslednje informacije o preskusni snovi:

(a) topnost v vodi (metoda A.6);

(b) topnost v organskih topilih;

(c) tlak pare (metoda A.4) in Henryjeva konstanta;

(d) porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);

(e) kemijska stabilnost v temi (hidroliza) (metoda C.7);

(f) pK_a, če je molekula nagnjena k dodajanju ali odvzemanju protonov [Smernica OECD 112] (16).

Druge uporabne informacije lahko vključujejo podatke o toksičnosti preskusne snovi na talne mikroorganizme [metodi preskušanja C.21 in C.22] (16).

Na voljo morajo biti analitske metode (vključno z metodami ekstrakcije in očiščenja) za količinsko opredelitev in določitev preskusne snovi in njenih produktov transformacije.

1.6 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Vzorci tal se tretirajo s preskusno snovjo in inkubirajo v temi v bučkah biometričnega tipa ali v pretočnih sistemih v nadzorovanih laboratorijskih razmerah (pri stalni temperaturi in vlažnosti tal). Po ustreznih časovnih presledkih se vzorci tal ekstrahirajo in analizirajo se osnovna snov in produkti transformacije. Tudi hlapni produkti se zberejo za analizo z ustreznimi absorpcijskimi pripomočki. Z uporabo materiala z oznako ^{14}C se lahko izmerijo različne stopnje mineralizacije preskusne snovi z zajemanjem sproščenega $^{14}CO_2$ in ugotovi se masna bilanca, vključno z nastajanjem talnih vezanih ostankov.

1.7 MERILA KAKOVOSTI

1.7.1 **Izkoristek**

Ekstrakcija in analiza najmanj dvojnih vzorcev tal takoj po dodajanju preskusne snovi da prvi prikaz ponovljivosti analitske metode in izenačenosti postopka uporabe za preskusno snov. Izkoristki poznejših stopenj poskusov so podani z ustreznimi masnimi bilancami. Izkoristki so v razponu od 90 % do 110 % pri označenih kemikalijah (8) in od 70 % do 110 % pri neoznačenih kemikalijah (3).

([1]) Na primer, če preskusna snov vsebuje en obroč, je potrebna oznaka tega obroča; če preskusna snov vsebuje dva ali več obročev, so lahko potrebne študije za ovrednotenje usode vsakega označenega obroča in pridobitev ustreznih informacij o oblikovanju produktov transformacije.

▼B

1.7.2 **Ponovljivost in občutljivost analitske metode**

Ponovljivost analitske metode (brez začetne učinkovitosti ekstrakcije) za količinsko določitev preskusne snovi in proizvodov transformacije se lahko preveri z dvojno analizo istega ekstrakta tal, ki je inkubiran dovolj dolgo, da nastajajo proizvodi transformacije.

Meja detekcije analitske metode za preskusno snov in za proizvode transformacije mora biti najmanj 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ tal (kot preskusne snovi) ali 1 % uporabljenega odmerka, kar je manj. Opredeliti je treba tudi mejo količinske opredelitve.

1.7.3 **Točnost podatkov transformacije**

Regresijska analiza koncentracij preskusne snovi v funkciji časa daje ustrezne informacije o zanesljivosti krivulje transformacije in omogoča izračun intervala zaupanja za razpolovne dobe (v primeru psevdo kinetike prvega reda) ali vrednosti DT_{50} in, če je primerno, vrednosti DT_{75} in DT_{90}.

1.8 OPIS PRESKUSNE METODE

1.8.1 **Oprema in kemijski reagenti**

Inkubacijski sistemi so sestavljeni iz statičnih zaprtih sistemov ali ustreznih pretočnih sistemov (7) (17). Primera ustrezne pretočne naprave za inkubacijo tal in bučke biometričnega tipa sta prikazana na slikah 1 in 2. Obe vrsti inkubacijskih sistemov imata prednosti in omejitve (7) (17).

Potrebna je standardna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

— instrumenti za analizo, na primer oprema GLC, HPLC, TLC, vključno z ustreznimi sistemi detekcije za analiziranje radioaktivno označenih ali neoznačenih snovi ali inverzno metodo izotopskega redčenja,

— instrumenti za prepoznavanje (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itd.),

— tekočinski scintilacijski števec,

— oksidacijsko sredstvo za izgorevanje radioaktivnega materiala,

— centrifuga,

— naprave za ekstrakcijo (na primer centrifugirne epruvete za hladno ekstrakcijo in naprava Soxhlet za kontinuirano ekstrakcijo pod refluksom),

— instrumenti za koncentriranje raztopin in ekstraktov (npr. rotacijski evaporator),

— vodna kopel,

— mehanska naprava za mešanje (npr. stroj za gnetenje, rotacijski mešalnik).

▼B

Uporabljeni kemični reagenti vključujejo na primer:

— NaOH, analitsko čist, 2 mol· dm^{-3} ali drugo ustrezno bazo (npr. KOH, etanolamin),

— H_2SO_4, analitsko čisto, 0,05 mol· dm^{-3},

— etilen glikol, analitsko čist,

— trdne absorpcijske materiale, na primer natrijevo sol in poliuretanske čepe,

— organska topila, analitsko čista, na primer aceton, metanol itd.,

— scintilacijsko tekočino.

1.8.2 **Aplikacija preskusne snovi**

Za dodajanje in porazdelitev v tla se lahko preskusna snov raztopi v vodi (deionizirani ali destilirani) ali po potrebi v manjši količini acetona ali drugega organskega topila (6), v katerem je preskusna snov dovolj topna in stabilna. Vendar količina izbranega topila ne sme znatno vlivati na mikrobno dejavnost v tleh (glej oddelke 1.5 in 1.9.2–1.9.3.) Uporabi topil, ki zavirajo mikrobno dejavnost, na primer kloroformu, diklorometanu in drugim halogeniranim topilom, se je treba izogibati.

Preskusna snov se lahko doda tudi kot trdna, npr. pomešana v kremenov pesek (6) ali v majhen podvzorec preskusnih tal, ki je bil posušen na zraku in steriliziran. Če se preskusna snov doda z uporabo topila, je treba topilu omogočiti, da izhlapi, preden se v originalni nesterilni vzorec tal doda primešan podvzorec.

Pri splošnih kemikalijah, katerih glavna pot vstopa v tla je preko odpadnega blata/kmetijskega nanosa, je treba preskusno snov najprej dodati v blato, ki se potem uvede v vzorec tal (glej oddelka 1.9.2 in 1.9.3).

Ne priporoča se rutinska uporaba formuliranih pripravkov. Vendar je uporaba formuliranega materiala lahko ustrezna rešitev npr. pri slabo topnih preskusnih snoveh.

1.8.3 **Tla**

1.8.3.1 *Izbira tal*

Za določitev poti transformacije se lahko uporabijo reprezentativna tla; priporoča se peščena ilovica ali muljasta ilovica ali ilovica ali ilovnati pesek [v skladu s klasifikacijo FAO in USDA (18)] s pH 5,5–8,0, vsebnostjo organskega ogljika 0,5–2,5 % in mikrobno biomaso najmanj 1 % skupnega organskega ogljika (10).

Za preučevanje stopnje transformacije je treba uporabiti najmanj tri dodatne vzorce tal, ki predstavljajo izbor ustreznih tal. Tla se morajo razlikovati po vsebnosti organskega ogljika, pH, vsebnosti gline in mikrobne biomase (10).

▼B

Vse vrste tal je treba opredeliti vsaj glede teksture (% peska, % mulja, % gline) [v skladu s klasifikacijo FAO in USDA (18)], pH, kationske izmenjalne kapacitete, organskega ogljika, gostote v razsutem stanju, značilnosti zadrževanja vode ([1]) in mikrobne biomase (le za aerobne študije). Dodatne informacije o lastnostih tal so lahko koristne pri razlagi rezultatov. Za določitev lastnosti tal se lahko uporabijo metode, priporočene v sklicih (19) (20) (21) (22) (23). Mikrobno biomaso je treba določiti z uporabo metode respiracije, ki jo povzroči substrat (25) (26), ali z alternativnimi metodami (20).

1.8.3.2 *Odvzemanje, obravnavanje in shranjevanje tal*

Na voljo morajo biti podrobne informacije o preteklosti mesta vzorčenja, kjer se odvzemajo tla za preskus. Podrobnosti vključujejo točno lokacijo, pokritost z vegetacijo, uporabo kemikalij, uporabo organskih in anorganskih gnojil, dodatke bioloških materialov ali drugo kontaminacijo. Če so bila tla tretirana s preskusno snovjo ali analognimi strukturami, se ne uporabljajo v študijah transformacije (10) (15).

Tla je treba na sveže odvzeti na terenu (iz horizonta A ali zgornjega 20 cm sloja) z vsebnostjo vode, ki omogoča presejanje. Pri tleh, ki niso iz riževih polj, se je treba izogibati vzorčenju med ali takoj po dolgih obdobjih (> 30 dni) suše, zmrzali ali poplave (14). Vzorce je treba prepeljati na način, ki čim bolj zmanjša spremembe v vsebnosti vode v tleh in jih čim bolj zadrževati v temi, brez dostopa do zraka. V ta namen je na splošno primerna ohlapno zavezana polietilenska vreča.

Tla se obdelajo čimprej po vzorčenju. Vegetacijo, večje živalske vrste in kamne v tleh je treba odstraniti, preden se tla presujejo skozi 2 mm sito, ki odstrani manjše kamne, živalske vrste in rastlinske odpadke. Obsežnemu sušenju in drobljenju tal pred sejanjem se je treba izogibati (15).

Kadar je pozimi jemanje vzorcev na terenu težko (tla zamrznjena ali prekrita s plastmi snega), se smejo vzeti iz serije tal, shranjenih v topli gredi pod rastlinsko prevleko (npr. travo ali mešanico trave in detelje). Močno se priporočajo študije s tlemi, ki so na sveže odvzeta na terenu, če pa je treba odvzeta in obdelana tla pred začetkom študije shraniti, je potrebno skladiščenje v ustreznih razmerah in samo za omejen čas (4 ± 2 °C za največ tri mesece), da se ohrani mikrobna dejavnost ([2]). Podrobna navodila o odvzemanju, obravnavanju in shranjevanju tal, ki se uporabljajo za biotransformacijske poskuse, so v (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Sposobnost tal glede zadrževanja vode se lahko izmeri kot poljska kapaciteta tal za vodo, kot zmogljivost zadrževanja vode ali kot pritisk črpanja vode (pF). Za razlago glej Dodatek 1. V poročilu o preskusu je treba navesti, ali sta bili sposobnost zadrževanja vode in gostota v razsutem stanju določeni v neoviranih vzorcih zemljišča ali v oviranih (predelanih) vzorcih.

([2]) Rezultati novejših raziskav kažejo, da se lahko tudi tla iz zmernih pasov shranijo pri –20 °C za več kakor tri mesece (28) (29) brez večjih izgub mikrobne dejavnosti.

▼B

Preden se obdelana tla uporabijo za ta preskus, jih je treba predhodno inkubirati, da se omogoči kaljenje in odstranitev semen in ponovna vzpostavitev ravnovesja mikrobne presnove po spremembi razmer med vzorčenjem ali shranjevanjem na inkubacijske razmere. Na splošno zadošča obdobje predhodne inkubacije od 2 do 28 dni, ki približa pogoje temperature in vlage dejanskemu preskusu (15). Skupen čas shranjevanja in predhodne inkubacije ne sme presegati treh mesecev.

1.9 IZVEDBA PRESKUSA

1.9.1 **Preskusni pogoji**

1.9.1.1 *Preskusna temperatura*

V celotnem obdobju preskusa morajo biti tla inkubirana v temi pri stalni temperaturi, ki je reprezentativna za podnebne razmere, kjer bo potekala uporaba ali sproščanje. Temperatura 20 ± 2 °C se priporoča za vse preskusne snovi, ki lahko pridejo v tla v zmernih podnebjih. Temperaturo je treba spremljati.

Za kemikalije, ki se uporabljajo ali sproščajo v hladnejših podnebjih (npr. v severnih državah v jesenskih/zimskih obdobjih), je treba inkubirati dodatne vzorce tal, vendar pri nižji temperaturi (npr. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Vsebnost vlage*

Za preskuse transformacije v aerobnih razmerah je treba prilagoditi vsebnost vlage[4] in jo vzdrževati pri pF med 2,0 in 2,5 (3). Vsebnost vlage v tleh je izražena kot masa vode na maso suhih tal in se mora redno nadzorovati (npr. v 2-tedenskih razmikih) s tehtanjem inkubacijskih buč in izgubo vode nadomestiti z dodajanjem vode (najbolje s sterilno filtrirano vodo iz pipe). Paziti je treba, da se preprečijo ali čim bolj zmanjšajo izgube preskusne snovi in/ali produktov transformacije z izhlapevanjem in/ali fotorazgradnjo (če obstaja) med dodajanjem vlage.

Za preskuse transformacije v razmerah anaerobnih in riževih tal se tla prepojijo z vodo s poplavljanjem.

1.9.1.3 *Aerobne inkubacijske razmere*

V pretočnih sistemih se aerobne razmere ohranjajo s prekinjenim splakovanjem ali z neprekinjenim prezračevanjem z navlaženim zrakom. V biometričnih bučkah se izmenjava zraka ohranja z difuzijo.

1.9.1.4 *Sterilne aerobne razmere*

Da bi dobili informacije o ustreznosti abiotske transformacije preskusne snovi, se lahko vzorci tal sterilizirajo (glede sterilizacijskih metod glej sklica 16 in 29), tretirajo s sterilno preskusno snovjo (npr. dodatek raztopine skozi sterilni filter) in prezračijo z navlaženim sterilnim zrakom, kot je opisano v oddelku 1.9.1.3. Pri riževih tleh je treba tla in vodo sterilizirati in izvesti inkubacijo, kot je opisano v oddelku 1.9.1.6.

▼B

1.9.1.5 *Anaerobne inkubacijske razmere*

Za vzpostavitev in ohranjanje anaerobnih razmer se tla, ki so tretirana s preskusno snovjo in inkubirana v aerobnih razmerah za 30 dni ali eno razpolovno dobo ali DT_{50} (kar je krajše), potem namočijo z vodo (1–3 cm plast vode), inkubacijski sistem pa se spere z inertnim plinom (npr. dušikom ali argonom) ([1]). Preskusni sistem mora omogočati meritve, kot na primer pH, koncentracijo kisika in redoks potenciala, ter vključevati naprave za zajemanje hlapnih produktov. Biometrični tip sistema mora biti zaprt, da se izogne vstopu zraka z difuzijo.

1.9.1.6 *Razmere inkubacije na riževih poljih*

Za preučevanje transformacije na riževih tleh se tla poplavijo s približno 1–5 centimetrsko plastjo vode, preskusna snov pa se nanese na vodno fazo (9). Priporočena globina tal je najmanj 5 cm. Sistem se prezračuje z zrakom, kakor v aerobnih razmerah, spremljati in poročati pa je treba o pH, koncentraciji kisika in redoks potencialu vodne plasti. Pred začetkom študij transformacije je potrebno najmanj dvotedensko obdobje predhodne inkubacije (glej oddelek 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Trajanje preskusa*

Stopnja in pot študije normalno ne sme presegati 120 dni ([2]) (6) (8), ker se po tem pričakuje postopno upadanje mikrobne dejavnosti v tleh v umetnem laboratorijskem sistemu, izoliranem od naravnega dopolnjevanja. Kadar je treba opredeliti zmanjševanje preskusne snovi in nastajanje ali zmanjševanje glavnih produktov transformacije, se lahko študije nadaljujejo v daljših obdobjih (npr. 6 ali 12 mesecev) (8). Daljša inkubacijska obdobja je treba utemeljiti v poročilu o preskusu in priložiti meritve biomase na koncu teh obdobij in med njimi.

1.9.2 **Izvajanje preskusa**

V vsako inkubacijsko bučko (glej sliki 1 in 2 v Dodatku 3) se vloži približno 50 do 200 g tal (na osnovi suhe teže) in tla, tretirana s preskusno snovjo po eni od metod, opisanih v oddelku 1.8.2. Če se za aplikacijo preskusne snovi uporabijo organska topila, jih je treba odstraniti iz tal z izhlapevanjem. Potem se tla temeljito premešajo z lopatico in/ali stresanjem bučk. Če se študija izvaja v razmerah riževega polja, je treba tla in vodo po aplikaciji preskusne snovi temeljito premešati. Majhne alikvote (npr. 1 g) tretiranih tal je treba analizirati glede preskusne snovi, da se preveri enotna porazdelitev. Za alternativne metode glej spodaj.

([1]) Aerobne razmere prevladujejo v površinskih tleh in celo v podpovršinskih tleh, kot je prikazano v raziskovalnem projektu, ki ga je sponzorirala EU (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17.–21. avgust 1992, Sigtuna, Švedska). Anaerobne razmere se lahko samo občasno pojavijo med poplavami tal po hudem deževju ali kadar so vzpostavljene namakalne razmere na riževih poljih.

([2]) Aerobne študije se lahko prekinejo precej pred 120 dnevi, pod pogojem, da je do takrat jasno dosežena pot transformacije in dokončna mineralizacija. Prekinitev preskusa je mogoča po 120 dneh ali ko je transformiranih najmanj 90 % preskusne snovi, vendar le, če je oblikovanih najmanj 5 % CO_2.

▼B

Stopnja tretiranja naj ustreza največji stopnji aplikacije izdelka za zaščito pridelka, priporočeni v navodilih za uporabo in enotni vključitvi v ustrezno globino polja (npr. 10 cm vrhnje plasti tal [1]). Na primer za kemikalije, uporabljene na listju ali tleh brez vključitve, je ustrezna globina za izračun, koliko kemikalije bi bilo treba dodati v vsako bučko, 2,5 cm. Za kemikalije, vključene v tla, je ustrezna globina vključitve opredeljena v navodilih za uporabo. Za splošne kemikalije se stopnja uporabe oceni na podlagi najustreznejše poti vstopa, na primer, če je glavna pot vstopa v tla preko odpadnega blata, se kemikalija dozira v blato s koncentracijo, ki odraža pričakovano koncentracijo blata in mora količina blata, dodanega v tla, odražati normalno nalaganje blata na kmetijska tla. Če ta koncentracija ni dovolj visoka za ugotavljanje produktov transformacije, lahko pomagajo ločeni vzorci tal, ki vsebujejo višje stopnje, vendar se je treba izogibati pretiranim stopnjam, ki vplivajo na mikrobne funkcije tal (glej oddelka 1.5 in 1.8.2).

Namesto tega se večja serija (npr. 1 do 2 kg) tal lahko tretira s preskusno snovjo, pazljivo primešano v ustreznem mešalnem stroju in potem v manjših 50 do 200 gramskih delih prenešeno v inkubacijske bučke (na primer z uporabo razdeljenih vzorcev). Manjše alikvote (npr. 1 g) tretirane serije tal je treba analizirati glede preskusne snovi, da se preveri enotna porazdelitev. Tak postopek se priporoča, ker omogoča enotnejšo porazdelitev preskusne snovi v tla.

Tudi netretirani vzorci tal se inkubirajo v enakih razmerah (aerobnih) kot vzorci, tretirani s preskusno snovjo. Ti vzorci se uporabijo za meritve biomase na koncu študij in med njimi.

Kadar se preskusna snov uporabi na tleh, raztopljenih z organskim topilom ali topili, se vzorci tal, tretirani z enako količino topil(a), inkubirajo v enakih razmerah (aerobnih) kakor vzorci, tretirani s preskusno snovjo. Ti vzorci se uporabljajo za začetne meritve biomase na koncu študij in med njimi za preverjanje učinkov topil(a) na mikrobno biomaso.

Bučke, ki vsebujejo tretirana tla, so bodisi priložene pretočnemu sistemu, opisanemu v sliki 1, ali zaprte z absorpcijsko kolono, prikazano v sliki 2 (glej Dodatek 3).

([1]) Izračun začetne koncentracije na področni osnovi z uporabo naslednje enačbe:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = začetna koncentracija v tleh [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = stopnja aplikacije [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = gostota plasti tal na polju[m]; d = gostota suhih tal v razsutem stanju [m]; d = gostota sunih tal v razsutem stanju [$kg \cdot m^{-3}$].

Praviloma daje stopnja uporabe 1 $kg\text{-}ha^{-1}$ v tleh koncentracijo približno 1 $mg \cdot kg^{-1}$ v 10-centimetrski plasti (ob predpostavki gostote v razsutem stanju 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Vzorčenje in meritve**

Dvojne inkubacijske bučke se odstranijo v ustreznih časovnih razmikih in vzorci tal se ekstrahirajo z ustreznimi topili različne polarnosti in analizirajo glede preskusne snovi in/ali produktov transformacije. Dobro načrtovana študija vključuje dovolj bučk, tako da se pri vsakem vzorčenju žrtvujeta dve bučki. Tudi absorpijske raztopine ali trdni absorpcijski materiali se odstranijo v različnih časovnih razmikih (v prvem mesecu v 7-dnevnih razmikih in po prvem mesecu 17-dnevnih razmikih) med in na koncu inkubacije vsakega vzorca tal in analizirajo glede hlapnih produktov. Poleg vzorca tal, vzetega neposredno po uporabi (vzorec dneva 0), se vključi najmanj 5 dodatnih vzorčnih točk. Časovne razmike je treba izbrati na tak način, da je mogoče vzpostaviti vzorec zmanjševanja preskusne snovi in vzorce nastajanja in zmanjševanja produktov transformacije (npr. 0, 1, 3, 7 dni; 2, 3 tedne; 1, 2, 3 mesece itd.).

Pri uporabi preskusne snovi z oznako ^{14}C, se količinsko določi neizločljiva radioaktivnost z izgorevanjem in izračuna masna bilanca za vsak vzorčni interval.

V primeru anaerobne in riževe inkubacije se talna in vodna faza skupaj analizirata glede preskusne snovi in produktov transformacije ali ločeno s filtracijo ali centrifugitanjem pred ekstrakcijo in analizo.

1.9.4 **Neobvezni preskusi**

Aerobne, nesterilne študije pri dodatnih temperaturah in vlagi tal so lahko koristne pri oceni vpliva temperature in vlage tal na stopnje transformacije preskusne snovi in/ali produktov njene transformacije v tleh.

Nadaljnja opredelitev neizločljive radioaktivnosti se lahko poskuša recimo z uporabo izjemno kritične ekstrakcije tekočin.

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Količine preskusne snovi, produktov transformacije, hlapnih (samo v %) in neizločljivih snovi se podajo kot % uporabljenih začetnih koncentracij in, kadar je primerno, kot $mg \cdot kg^{-1}$ tal (na podlagi suhe teže tal) za vsak interval vzorčenja. Masno bilanco je treba podati v odstotku uporabljene začetne koncentracije za vsak interval vzorčenja. Grafična predstavitev koncentracij preskusne snovi glede na čas omogoča oceno njene razpolovne dobe transformacije ali DT_{50}. Treba je prepoznati glavne produkte transformacije in zarisati tudi njihove koncentracije glede na čas, da se prikažejo stopnje njihovega nastajanja in zmanjševanja. Glavni produkt transformacije je vsak produkt, ki predstavlja > 10 % uporabljenega odmerka v katerem koli času med študijo.

Zajeti hlapni produkti dajejo neko navedbo hlapnega potenciala preskusne snovi in njenih produktov transformacije iz tal.

▼B

Natančnejše določitve razpolovnih dob ali vrednosti DT_{50} in po potrebi DT_{75} in vrednosti DT_{90} je treba pridobiti z uporabo ustreznih izračunov kinetičnih modelov. Razpolovna doba in vrednosti DT_{50} se sporočajo skupaj z opisom uporabljenega modela, vrstnega reda kinetike in določitve koeficienta (r^2). Kinetika prvega reda ima prednost, razen če je $r^2 < 0,7$. Po potrebi se izračuni uporabijo tudi za glavne produkte transformacije. Primeri ustreznih modelov so opisani v sklicih od 31 do 35.

V primeru stopenjske študije, izvedene pri različnih temperaturah, so transformacijske stopnje opisane kot funkcija temperature v temperaturnem razponu pri poskusu z uporabo Arrheniusovega zakona v formuli:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } lnk = 1nA - \frac{B}{T},$$

kjer sta In A in B regresijski konstanti iz preseka in nagiba najboljše linije, nastale iz linearno padajoče 1n k do l/T, kjer je k konstantna stopnja pri temperaturi T in je T temperatura v Kelvinu. Paziti je treba na omejeni razpon temperature, v katerem je Arreheniusov zakon veljaven v primeru, če transformacijo ureja mikrobna dejavnost.

2.2 VREDNOTENJE IN RAZLAGA REZULTATOV

Čeprav se študije izvajajo v umetnem laboratorijskem sistemu, rezulati omogočajo ocene stopnje transformacije preskusne snovi in tudi stopnje nastajanja in zmanjševanja produktov transformacije v terenskih razmerah (36) (37).

Študija poti transformacije preskusne snovi zagotavlja informacije o poteh, po katerih se uporabljena snov strukturno spremeni v tleh s kemičnimi in mikrobnimi reakcijami.3.

POROČANJE

POROČILO O PRESKUSU

Poročilo o preskusu mora vključevati:

Preskusna snov:

— splošno ime, kemijsko ime, številko po CAS, strukturno formulo (z navedbo položaja oznak(e), kadar se uporabi radioaktivno označeni material) in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti (glej oddelek 1.5),

— čistost (nečistoče) preskusne snovi,

— radiokemijsko čistost označene kemikalije in specifično dejavnost (kjer je primerno).

Referenčne snovi:

— kemijsko ime in strukturo referenčnih snovi, uporabljenih za opredelitev in/ali določitev produktov transformacije.

Preskusna tla:

— podrobnosti o mestu odvzema,

— datum in postopek vzorčenja tal,

▼B

— lastnosti tal, kot so pH, vsebnost organskega ogljika, teksturo (% peska, % mulja, % gline), kationsko izmenjalno kapaciteto, gostoto v razsutem stanju, značilnost zadrževanja vode in mikrobno biomaso,

— dolžino shranjevanja tal in razmere shranjevanja (če se shranjuje).

Preskusni pogoji:

— datume izvajanja študij,

— količino uporabljene preskusne snovi,

— uporabljena topila in metodo aplikacije preskusne snovi,

— začetno težo tretiranih tal in vzorcev, odvzetih za analizo v vsakem časovnem obdobju,

— opis uporabljenega sistema inkubacije,

— stopnje pretoka zraka (le za pretočne sisteme),

— temperaturo poskusnega okolja,

— vsebnost vlage v tleh med inkubacijo,

— mikrobno biomaso na začetku, med potekom in na koncu aerobnih študij,

— pH, koncentracijo kisika in redoks potenciala na začetku, med potekom in na koncu študij anaerobnih in riževih tal,

— metodo(-e) ekstrakcije,

— metode za količinsko opredelitev in določitev preskusne snovi in glavnih produktov transformacije v tleh in absorpcijskih materialih,

— število ponovitev in število kontrol.

Rezultati:

— rezultat določitve mikrobne dejavnosti,

— ponovljivost in občutljivost uporabljenih analitskih metod,

— stopnje izkoristka (vrednosti v % za veljavno študijo so podane v oddelku 1.7.1),

— tabele rezultatov, izraženih kot % apliciranega začetnega odmerka in, kadar je primerno, kot $mg \cdot kg^{-1}$ tal (na osnovi suhe teže),

— masno bilanco med potekom in na koncu študij,

— opredelitev neizločljive (vezane) radioaktivnosti ali ostankov v tleh,

— količinsko opredelitev sproščenega CO_2 in drugih hlapnih spojin,

— prikaze koncentracij tal glede na čas za preskusno snov in, kadar je primerno, za glavne produkte transformacije,

— razpolovno dobo ali DT_{50}, DT_{75} in DT_{90} za preskusno snov in, kadar je primerno, za glavne produkte transformacije vključno z intervalom zaupanja,

▼B

— oceno stopnje abiotske razgradnje v sterilnih razmerah,

— oceno kinetike transformacije za preskusno snov in, kadar je primerno, za glavne produkte transformacije,

— predlagane poti transformacije, kadar je primerno,

— razpravo in razlago rezultatov,

— surove podatke (to je vzorčne kromatograme, vzorčne izračune stopenj transformacije in sredstev, uporabljenih za določitev produktov transformacije).

4. **LITERATURA**

(1) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Evropska Unija (EU) (1995). Direktiva Komisije 95/36/ES z dne 14. julija 1995 o spremembi Direktive Sveta 91/414/EGS o dajanju fitofarmacevtskih sredstev v promet. Priloga II, Del A in Priloga III, Del A: Vpliv in porazdelitev v okolju.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Priifung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4–1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SET AC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Priloga V k Dir. 67/548/EGS

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. AL. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215–221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105–120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59–63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68–69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197–200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz -Nachrichten Bayer 39, 188–204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

▼B

DODATEK 1

PRITISK VODE, POLJSKA KAPACITETA TAL ZA VODO (FC) IN ZMOGLJIVOST ZADRŽEVANJA VODE (WHC) [1]

Visina vodne kolone [cm]	pF [a]	bar [b]	Pripombe
10^7	7	10^4	suha tla
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	tocka izsusenosti
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	razpon poljske kapacitete tal za vodo [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (približek)
1	0	0,001	tla, nasičena z vodo

[a] pF = logaritem cm vodne kolone.
[b] 1 bar =105 Pa.
[c] Približno ustreza vsebnosti vode 10 % v pesku, 35 % v ilovici in 45 % v glini.
[d] Poljska kapaciteta tal za vodo ni stalna, ampak se spreminja z vrsto tal med pF 1,5 in 2,5.

Pritisk vode se meri v cm vodne kolone ali v barih. Zaradi velikega razpona vleka je pritisk izražen preprosto kot vrednost pF, ki je enaka logaritmu cm vodne kolone.

Poljska kapaciteta tal za vodo je opredeljena kot količina vode glede na maso, ki jo lahko naravna tla shranijo 2 dni po dolgem deževnem obdobju ali po zadostnem namakanju. Določi se v neoviranih tleh in situ na terenu. Merjenje se zato ne uporablja na oviranih laboratorijskih vzorcih tal. Vrednosti poljske kapacitete tal za vodo, določene v oviranih tleh lahko kažejo velika sistematična odstopanja.

Zmogljivost zadrževanja vode (WHC) je opredeljena v laboratoriju z neoviranimi in oviranimi tlemi z nasičenjem talne kolone z vodo s kapilarnim prenosom. Posebno uporabna je pri oviranih tleh in je lahko do 30 % večja kakor poljska kapaciteta tal za vodo (1). Eksperimentalno jo je tudi lažje določiti kakor zanesljive vrednosti poljske kapacitete.

Opombe

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

DODATEK 2

VSEBNOST VLAGE V TLEH (g vode na 100 g suhih tal) V RAZLIČNIH VRSTAH TAL V RAZLIČNIH DRŽAVAH

Vrsta tal	Država	Vsebnost vlage v tleh pri		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Pesek	Nemčija	28,7	8,8	3,9
Ilovnati pesek	Nemčija	50,4	17,9	12,1
Ilovnati pesek	Švica	44,0	35,3	9,2
Muljasta ilovica	Švica	72,8	56,6	28,4
Glinasta ilovica	Brazilija	69,7	38,4	27,3
Glinasta ilovica	Japonska	74,4	57,8	31,4
Peščena ilovica	Japonska	82,4	59,2	36,0
Muljasta ilovica	ZDA	47,2	33,2	18,8
Peščena ilovica	ZDA	40,4	25,2	13,3

([1]) Zmogljivost zadrževanja vode.

▼B

DODATEK 3

Slika 1

Primer pretočne naprave za preučevanje transformacije kemikalij v tleh ([1]) ([2])

1: igelni ventil

2: plinska jeklenka, ki vsebuje vodo

3: ultramembrana (le za sterilne razmere), velikost por 0,2 µm

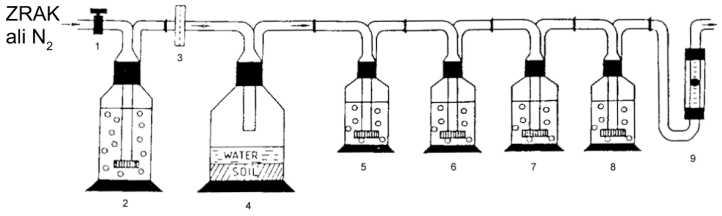
4: bučka za presnovo tal (prelita z vodo le pri anaerobnih in namakalnih razmerah)

5: lovilnik z etilen glikolom za organske hlapne spojine

6: lovilnik z žveplovo kislino za alkalne hlapne spojine

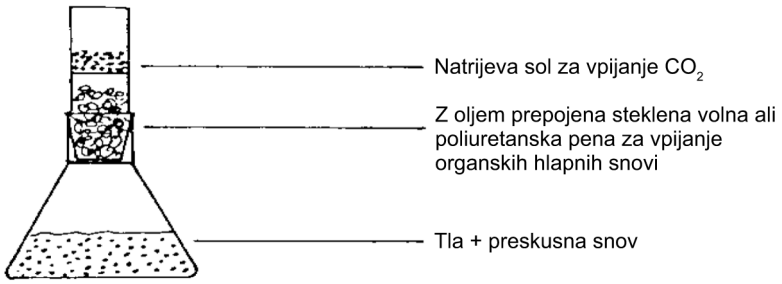
7, 8: lovilnik z natrijevim hidroksidom za CO_2 in druge kisle hlapne snovi

9: merilnik pretoka.



Slika 2

Primer bučke biometričnega tipa za preučevanje transformacije kemikalij v tleh ([3])



([1]) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

([2]) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

C.24 AEROBNA IN ANAEROBNA TRANSFORMACIJA V SISTEMIH VODNIH USEDLIN

1. METODA

Ta preskusna metoda ustreza metodi OECD TG 308 (2002).

1.1 UVOD

Kemikalije lahko vstopijo v plitve ali globoke površinske vode po poteh, kot so neposredni vnos, pronicanje pršenja, površinsko odtekanje, drenaža, odlaganje odpadkov, industrijske, domače ali kmetijske odplake in usedline iz zraka. Ta preskusna metoda opisuje laboratorijsko metodo za ocenjevanje aerobne in anaerobne transformacije organskih kemikalij v sistemih vodnih usedlin. Temelji na obstoječih smernicah (1) (2) (3) (4) (5) (6). Na delavnici OECD o izbiri tal/usedline, ki je bila leta 1995 v Belgiratu v Italiji (7), je bil dosežen dogovor predvsem o številu in vrstah tal za uporabo v tem preskusu. Dana so bila tudi priporočila v zvezi z odvzemanjem, obravnavanjem in shranjevanjem vzorcev usedlin, ki temeljijo na napotkih ISO (8). Take študije so potrebne za kemikalije, ki se vnašajo neposredno v vodo ali za katere je verjetno, da bodo prišle v vodno okolje po zgoraj opisanih poteh.

Razmere v naravnih sistemih vodnih usedlin so v zgornji vodni fazi pogosto aerobne. Površinska plast usedline je lahko bodisi aerobna ali anaerobna, globlje usedline pa so navadno anaerobne. Da bi zajeli vse te možnosti, so v tem dokumentu opisani tako aerobni kot anaerobni preskusi. Aerobni preskus simulira aerobno vodno kolono nad plastjo aerobne usedline, pod katero je anaerobno pobočje. Anaerobni preskus simulira povsem anaerobni sistem vode in usedline. Če okoliščine kažejo, da je treba znatno odstopati od teh priporočil, na primer z uporabo nedotaknjenih jeder usedlin ali usedlin, ki so bile morda izpostavljene preskusni snovi, so v ta namen na volji druge metode (9).

1.2 OPREDELITVE POJMOV

V vsakem primeru se uporabljajo standardne mednarodne enote (SI).

Preskusna snov: katera koli snov, bodisi osnovna ali ustrezni produkti transformacije.

Produkti transformacije: vse snovi, ki so posledica biotskih in abiotskih transformacijskih reakcij preskusne snovi, vključno s CO_2 in vezanimi ostanki.

Vezani ostanki: „vezani ostanki“ predstavljajo spojine v tleh, rastlinske ali živalske, ki vztrajajo v matrici v obliki osnovne snovi ali njenega metabolita ali njenih metabolitov/produktov po ekstrakciji. Ekstrakcijska metoda ne sme bistveno spremeniti samih spojin ali strukture matrice. Narava vezi se lahko delno pojasni z ekstrakcijskimi metodami, ki spreminjajo matrico, in z visoko razvitimi analitskimi tehnikami. Do sedaj so bile, na primer, na ta način odkrite kovalentne ionske in sorptivne vezi. Na splošno nastajanje vezanih ostankov znatno zmanjša biološko dostopnost in biološko razpoložljivost (10) [prikrojeno po IUPAC-u (11)].

▼B

Aerobna transformacija (oksidacija): reakcije, ki se pojavljajo v navzočnosti molekularnega kisika (12).

Anaerobna transformacija (redukcija): reakcije, ki se pojavljajo v odsotnosti molekularnega kisika (12).

Naravne vode: so površinske vode, dobljene iz ribnikov, rek, potokov itd.

Usedlina: je mešanica mineralnih in organskih kemičnih sestavin, slednje vsebujejo spojine z visoko vsebnostjo ogljika in dušika in z veliko molsko maso. Odlaga jo naravna voda in tvori povezavo z vodo.

Mineralizacija: je popolna razgradnja organske spojine v CO_2, H_2O v aerobnih razmerah in CH_4, CO_2 in H_2O v anaerobnih razmerah. V smislu te preskusne metode, kjer se uporablja spojina z radioaktivno oznako, mineralizacija pomeni obsežno razgradnjo molekule, v kateri se označeni ogljikov atom oksidira ali količinsko reducira s sproščanjem ustrezne količine $^{14}CO_2$ oziroma $^{14}CH_4$.

Razpolovna doba, $t_{0,5}$, je čas, potreben za 50 %-no transformacijo preskusne snovi, kadar lahko transformacijo opišemo kot kinetiko prvega reda; razpolovna doba ni odvisna od začetne koncentracije.

Čas razgradnje DT_{50}: je čas, v katerem se začetna koncentracija preskusne snovi zmanjša za 50 %.

Čas razgradnje DT_{75}: je čas, v katerem se začetna koncentracija preskusne snovi zmanjša za 75 %.

Čas razgradnje DT_{90}: je čas, v katerem se začetna koncentracija preskusne snovi zmanjša za 90 %.

1.3 REFERENČNE SNOVI

Referenčne snovi se uporabljajo za določitev in količinsko opredelitev produktov transformacije s spektroskopsko in kromatografsko metodo.

1.4 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

Za merjenje stopnje transformacije se lahko uporabi neoznačena ali izotopno označena preskusna snov, čeprav se priporoča označeni material. Označeni material je potreben za preučevanje poti transformacije in za vzpostavitev masne bilance. Priporoča se oznaka ^{14}C, vendar je lahko koristna tudi uporaba drugih izotopov, na primer C, N, H, P. Ce je to mogoče, naj se oznaka namesti na najstabilnejši del(e) molekule ([1]). Kemijska in/ali radiokemij ska čistost preskusne snovi naj bo vsaj 95 %.

Pred izvajanjem preskusa morajo biti na voljo naslednje informacije o preskusni snovi:

(a) topnost v vodi (metoda A.6);

(b) topnost v organskih topilih;

(c) tlak pare (metoda A.4) in Henryjeva konstanta;

([1]) Na primer, če snov vsebuje en obroč, je potrebna oznaka tega obroča; če preskusna snov vsebuje dva ali več obročev, so lahko potrebne študije za ovrednotenje usode vsakega označenega obroča in pridobitev ustreznih informacij o oblikovanju produktov transformacije.

▼B

(d) porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (metoda A. 8);

(e) adsorpcijski koeficient (K_d, K_f or K_{oc}, kjer je primerno) (metoda C.18);

(f) hidroliza (metoda C.7);

(g) disociacijska konstanta (pK_a) [Smernica OECD 112] (13);

(h) kemijska struktura preskusne snovi in po potrebi položaj oznak(e) izotopa.

Opomba: Poročati je treba o temperaturi, pri kateri so bile opravljene te meritve.

Druge uporabne informacije lahko vključujejo podatke o toksičnosti preskusne snovi za talne mikroorganizme, podatke o lahki in/ali inherentni biorazgradljivosti in podatke o aerobni in anaerobni transformaciji v tleh.

Na voljo morajo biti analitske metode (vključno z metodami ekstrakcije in očiščenja) za določitev in količinsko opredelitev preskusne snovi in njenih produktov transformacije v vodi in usedlini (glej oddelek 1.7.2).

1.5 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Metoda, opisana v tem preskusu, uporablja sistem aerobnih in anaerobnih vodnih usedlin (glej Dodatek 1), ki omogoča:

— merjenje stopnje transformacije preskusne snovi v sistemu vode in usedline,

— merjenje stopnje transformacije preskusne snovi v usedlini,

— merjenje stopnje mineralizacije preskusne snovi in/ali njenih produktov transformacije (če se uporablja preskusna snov z oznako ^{14}C),

— določitev in količinsko opredelitev produktov transformacije v vodni fazi in fazi usedline, vključno z masno bilanco (če se uporablja označena preskusna snov),

— merjenje porazdelitve preskusne snovi in njenih produktov transformacije med dve fazi v času inkubacije v temi (na primer, da bi se izognili cvetenju alg) pri stalni temperaturi. Razpolovne dobe in vrednosti DT_{50}, DT_{75} in DT_{90} se določijo, kadar so podatki zanesljivi, vendar se ne smejo ekstrapolirati še dolgo po koncu poskusnega obdobja (glej oddelek 1.2).

Tako za aerobne kot za anaerobne študije sta potrebni najmanj dve usedlini in z njimi povezana voda (7). Seveda pa lahko obstajajo primeri, ko je treba uporabiti več kakor dve vodni usedlini, na primer, pri kemikaliji, ki je lahko navzoča v sveži vodi in/ali morskem okolju.

▼B

1.6 UPORABNOST PRESKUSA

Metoda se navadno uporablja za kemične snovi (brez oznake ali z radioaktivno oznako), za katere je na voljo dovolj natančna in občutljiva analitska metoda. Uporablja se za rahlo hlapne, nehlapne, vodotopne ali v vodi slabo topne spojine. Preskus naj se ne uporablja za kemikalije v vodi, ki so lahko hlapne (npr. fumiganti, organska topila) in se tako ne morejo zadrževati v vodi in/ali usedlini za poskusne pogoje tega preskusa.

Metoda se je do zdaj uporabljala za študije transformacije kemikalij v sveži vodi in usedlinah, vendar bi se načeloma lahko uporabljala tudi za morske rokave in priobalne sisteme. Ni pa primerna za simuliranje razmer v tekoči vodi (npr. rekah) ali na odprtem morju.

1.7 MERILA KAKOVOSTI

1.7.1 **Izkoristek**

Ekstrakcija in analiza najmanj dvojnih vzorcev vode in usedline takoj po dodajanju preskusne snovi da prvi prikaz ponovljivosti analitske metode in izenačenosti postopka uporabe za preskusno snov. Izkoristki poznejših stopenj poskusov so podani z ustreznimi masnimi bilancami (kadar se uporabi označeni material). Izkoristki so v razponu od 90 % do 110 % pri označenih kemikalijah (6) in od 70 % do 110 % pri neoznačenih kemikalijah.

1.7.2 **Ponovljivost in občutljivost analitske metode**

Ponovljivost analitske metode (brez začetne učinkovitosti ekstrakcije) za količinsko določitev preskusne snovi in proizvodov transformacije se lahko preveri z dvojno analizo istega ekstrakta vode ali vzorcev usedline, ki so bili inkubirani dovolj dolgo, da nastajajo proizvodi transformacije.

Meja detekcije analitske metode za preskusno snov in za proizvode transformacije mora biti najmanj 0,01 mg· kg^{-1} vode ali usedline (kot preskusne snovi) ali 1 % začetne količine, uporabljene v preskusnem sistemu, kar je manj. Opredeliti je treba tudi mejo količinske opredelitve.

1.7.3 **Točnost podatkov transformacije**

Regresijska analiza koncentracij preskusne snovi v funkciji časa daje ustrezne informacije o točnosti krivulje transformacije in omogoča izračun intervala zaupanja za razpolovne dobe (če se uporablja psevdo kinetika prvega reda) ali vrednosti DT_{50} in, če je primerno, vrednosti DT_{75} in DT_{90}.

1.8 OPIS METODE

1.8.1 **Preskusni sistem in naprave**

Studijo je treba opraviti v steklenih posodah (npr. steklenicah, epruvetah za centrifugiranje), razen če predhodne informacije (na primer porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda, sorpcijski podatki itd.) kažejo, da se lahko preskusna snov lepi na steklo in je treba v tem primeru razmisliti o drugem materialu (na primer o teflonu). Če je znano, da se preskusna snov oprijema stekla, je ta problem mogoče odpraviti z eno ali več od naslednjih metod:

▼B

— določimo maso preskusne snovi in produktov transformacije, ki so se oprijeli stekla,

— zagotovimo, da se na koncu preskusa vsa steklena oprema izpere z raztopino,

— uporabimo formulirane produkte (glej tudi oddelek 1.9.2),

— uporabimo povečano količino pomožnega topila za dodajanje preskusne snovi v sistem; če se uporablja pomožno topilo, naj bo to pomožno topilo, ki ne raztaplja preskusne snovi.

Primera tipičnih preskusnih naprav, to je plinske pretočne naprave in sistema biometričnega tipa, sta prikazana v dodatkih 2 in 3 (14). Drugi uporabni inkubacijski sistemi so opisani v sklicu 15. Načrt poskusne naprave mora omogočati izmenjavo zraka ali dušika in zajemanje hlapnih produktov. Mere naprave morajo izpolnjevati zahteve preskusa (glej oddelek 1.9.1). Prezračevanje se lahko zagotovi bodisi z blagim vpihavanjem mehurčkov ali spuščanjem zraka ali dušika preko vodne površine. V slednjem primeru je priporočljivo rahlo mešanje vode od zgoraj zaradi boljše porazdelitve kisika ali dušika v vodi. Zrak brez CO_2 se ne sme uporabljati, ker lahko povzroči povečanje pH vode. V obeh primerih je nezaželeno motenje usedline in se je treba temu čim bolj izogibati. Rahlo hlapne kemikalije je treba preskusiti v sistemu biometričnega tipa z blagim mešanjem vodne površine. Lahko se uporabljajo tudi zaprte posode z volumnom nad vzorcem bodisi z atmosferskim zrakom ali dušikom in notranjimi stekleničkami za zajemanje hlapnih produktov (16). Pri aerobnem preskusu je potrebna redna izmenjava plina v volumnu nad vzorcem, da se nadomesti kisik, ki ga porabi biomasa.

Primerni lovilniki za zbiranje hlapnih produktov transformacije med drugim zajemajo 1 $mol \cdot dm^{-3}$ raztopine kalijevega hidroksida ali natrijevega hidroksida za ogljikov dioksid [9] in etilen glikol, etanolamin ali 2 % parafin v ksilenu za organske spojine. Hlapne snovi, ki nastanejo v anaerobnih razmerah, kot na primer metan, se lahko zberejo recimo z molekulskimi siti. Take hlapne snovi se lahko sežgejo, na primer v CO_2, tako da se plin spusti skozi kremenovo epruveto, napolnjeno s CuO, pri temperaturi 900 ^{o}C in se nastali CO_2 zajame v absorpcijsko posodo z alkalijskimi snovmi (17).

Potrebni so laboratorijski instrumenti za kemijsko analizo preskusne snovi in produktov transformacije (npr. plinsko tekočinsko kromatografijo (GLC), tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), tankoplastno kromatografijo (TLC), masno spektroskopijo (MS), plinsko kromatografijo-masno spektroskopijo (GC-MS), tekočinsko kromatografijo-masno spektroskopijo (LC-MS), jedrsko magnetno resonanco (NMR) itd.), vključno s sistemi detekcije radioaktivno označenih ali neoznačenih kemikalij, kot je primerno. Kadar se uporablja radioaktivno označeni material, sta potrebna tudi tekočinski scintilacijski števec in oksidacijsko sredstvo za izgorevanje (za sežig vzorcev usedline pred analizo radioaktivnosti).

Po potrebi se zahteva še druga standardna laboratorijska oprema za fizikalno-kemijske in biološke določitve (glej oddelek tabele 1, oddelek 1.8.2.2), steklena posoda, kemikalije in reagenti.

▼B

1.8.2 **Izbira in število vodnih usedlin**

Mesta vzorčenja je treba izbrati v skladu z namenom preskusa v dani situaciji. Pri izbiranju mesta vzorčenja je treba upoštevati preteklost morebitnih kmetijskih, industrijskih ali domačih vnosov v zajetje in vode v zgornjem toku. Usedline se ne smejo uporabiti, če so bile v predhodnih 4 letih kontaminirane s preskusno snovjo ali analognimi strukturami.

1.8.2.1 Izbira usedine

Za aerobne študije se navadno uporabita dve usedlini (7). Izbrani usedlini se morata razlikovati glede vsebnosti organskega ogljika in teksture. Ena usedlina naj ima visoko vsebnost organskega ogljika (2,5–7,5 %) in fino teksturo, druga usedlina naj ima nizko vsebnost organskega ogljika (0,5–2,5 %) in grobo teksturo. Razlika med vsebnostjo organskega ogljika naj bo normalno vsaj 2 %. „Fina tekstura“ je opredeljena kot vsebnost [gline + mulja] [10] > 50 % in „groba tekstura“ je opredeljena kot vsebnost [gline + mulja] < 50 %. Razlika v vsebnosti [gline + mulja] obeh usedlin naj bo normalno vsaj 20 %. V primerih, ko lahko pride kemikalija tudi v morsko vodo, naj bo vsaj en sistem vode in usedline morskega izvora.

Pri povsem anaerobnih študijah, je treba vzorce za dve usedlini (vključno z njunimi povezanimi vodami) vzeti iz anaerobnih con teles površinskih vod (7). Z obema fazama, fazo usedline in vodno fazo, je treba ravnati previdno in ju prenesti brez navzočnosti kisika.

Pri izbiri usedlin so lahko pomembni še drugi parametri in jih je treba upoštevati za vsak primer posebej. Na primer razpon pH usedlin bi bil pomemben za preskušanje kemikalij, pri katerih je transformacija in/ali sorpcija lahko odvisna od pH. Odvisnost sorpcije od pH se lahko odraža v pK_a preskusne snovi.

1.8.2.2 Opis značilnosti vzorcev vode in usedline

Ključni parametri, ki se morajo izmeriti in je treba o njih poročati (s sklicevanjem na uporabljeno metodo) tako za vodo kot usedlino, in stopnja preskusa, pri kateri je treba te parametre določiti, so povzeti v tukajšnji tabeli. Metode za določanje teh parametrov so v vednost podane v sklicih (18) (19) (20) (21).

Poleg tega utegne biti glede na posamezen primer potrebno izmeriti in poročati o drugih parametrih (npr. za svežo vodo: o delcih, alkalnosti, trdoti, prevodnosti, NO_3/PO_4 (razmerje in posamezne vrednosti); za usedline: o kationski izmenjalni kapaciteti, zmogljivosti zadrževanja vode, karbonatu, skupnem dušiku in fosforju in za morske sisteme: o slanosti). Analiza nitrata, sulfata, biološko razpoložljivega železa in drugih možnih sprejemnikov elektronov v usedlinah in vodah je lahko koristna tudi pri ocenjevanju redoks pogojev, zlasti v zvezi z anaerobno transformacijo.

▼B

Meritve parametrov za opredelitev vzorcev vode in usedline (7) (22) (23)

Parameter	Stopnja preskusnega postopka					
	Terensko vzorčenje	Poznejše ravnanje	Začetek prilagoditve	Začete k preskusa	Med preskusom	Konec preskusa
Voda						
Izvor/vir	X					
Temperatura	X					
pH	X		X	X	X	X
Skupni organski ogljik			X	X		X
Koncentracija O_2 (*)	X		X	X	X	X
Redoks potencial (*)			X	X	X	X
Usedlina						
Izvor/vir	X					
Globina plasti	X					
pH		X	X	X	X	X
Porazdelitev velikosti delcev		X				
Skupni organski ogljik		X	X	X		X
Microbna biomasa (*)		X		X		X
Redoks potencial (**)	Opazovanje (barva/vonj)		X	X	X	X

(*) Metoda stopnje mikrobne respiracije (26), metoda zaplinjanja (27) ali meritve s štetjem (npr. bakterij, aktinomicet, gliv in skupnih kolonij) pri aerobnih študijah; stopnja metanogeneze pri anaerobnih študijah.

(**) Rezultati novejših raziskav kažejo, da meritve koncentracij kisika v vodi in redoks potencialov nimajo niti mehanistične niti napovedovalne vrednosti glede rasti in razvoja mikrobnih populacij na površini teh vod (24) (25). Boljša orodja za razlago in vrednotenje stopenj in poti aerobne biotransformacije so lahko določitev potrebe po biokemijskem kisiku (BOD pri terenskem vzorčenju, na začetku in na koncu preskusa) in koncentracij mikro/makro hranilnih snovi Ca, Mg in Mn (na začetku in na koncu preskusa) v vodi in meritve skupnega N in skupnega P v usedlinah (pri terenskem vzorčenju in na koncu preskusa).

1.8.3 **Odvzemanje, obravnavanje in shranjevanje**

1.8.3.1 *Odvzemanje*

Pri vzorčenju usedlin je treba upoštevati osnutek smernice ISO o vzorčenju usedlin z dna (8). Vzorce usedlin je treba jemati s celotnih 5 do 10 cm zgornje plasti usedline. Z usedlino povezano vodo je treba odvzeti z istega mesta ali lokacije in v istem času kakor usedlino. Pri anaerobnih študijah je treba usedline in z njimi povezano vodo vzorčiti in prevažati brez navzočnosti kisika (28) (glej oddelek 1.8.2.1). Nekaj pripomočkov za vzorčenje je opisanih v literaturi (8) (23).

▼B

1.8.3.2 *Ravnanje*

Usedlina se loči od vode s filtriranjem in se mokro preseje skozi 2 mm sito z uporabo odvečne vode z lokacije, ki se nato zavrže. Nato se znane količine usedlin in vode zmešajo v želenem razmerju (glej oddelek 1.9.1) v inkubacijskih bučkah in pripravijo za prilagoditveno obdobje (glej oddelek 1.8.4). Pri anaerobnih študijah je treba vse stopnje ravnanja opraviti brez navzočnosti kisika (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3 *Shranjevanje*

Močno se priporoča uporaba sveže odvzetih vzorcev usedlin in vode, če pa je nujno shranjevanje, je treba usedlino in vodo presejati, kakor je opisano zgoraj, in shraniti skupaj, namočeno v vodi (6–10 cm plast vode) v temi pri 4 ± 2 °C[4] za največ 4 tedne (7) (8) (23). Vzorce, ki se uporabijo za aerobne študije, je treba shraniti s prostim dostopom do zraka (npr. v odprtih posodah), tiste za anaerobne študije pa brez navzočnosti kisika. Med prevozom in shranjevanjem ne sme priti do zamrznitve usedlin in vode in izsuševanja usedline.

1.8.4 **Priprava vzorcev usedline/vode za preskus**

Obdobje prilagoditve naj poteka pred dodajanjem preskusne snovi, vsak vzorec usedline/vode se položi v inkubacijsko posodo za uporabo pri glavnem preskusu, prilagoditev pa naj se izvaja v povsem enakih razmerah kakor preskusna inkubacija (glej oddelek 1.9.1). Prilagoditveno obdobje je čas, potreben, da se doseže razumna stabilnost sistema, kot jo odražajo pH, koncentracija kisika v vodi, redoks potencial usedline in vode in makroskopska ločitev faz. Obdobje prilagoditve naj normalno traja od enega tedna do dveh tednov in ne sme presegati štirih tednov. Poročati je treba o rezultatih določitev, ki se izvedejo v tem obdobju.

1.9 IZVEDBA PRESKUSA

1.9.1 **Preskusni pogoji**

Preskus je treba izvesti v inkubacijski napravi (glej oddelek 1.8.1) z vodno usedlino v volumenskem razmerju med 3: 1 in 4: 1 in plastjo usedline 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Priporočena najmanjša količina na inkubacijsko posodo je 50 g usedline (na osnovi suhe teže).

Preskus je treba opraviti v temi pri stalni temperaturi v razponu od 10 do 30 °C. Primerna je temperatura (20 ± 2) °C. Po potrebi se lahko v posameznih primerih, odvisno od informacij, ki se zahtevajo od preskusa, razmisli o dodatni nižji temperaturi (npr. 10 °C). Inkubacijsko temperaturo je treba spremljati in o njej poročati.

([1]) Novejše študije so pokazale, da lahko shranjevanje pri 4 °C vodi v zmanjšanje vsebnosti organskega ogljika v usedlini, kar lahko povzroči tudi zmanjšanje mikrobne dejavnosti (34).

▼B

1.9.2 **Ravnanje s preskusno snovjo in njena uporaba**

Uporabi se ena preskusna koncentracija kemikalije ([1]). Pri kemikalijah za zaščito pridelka, ki se vnašajo neposredno v vodna telesa, se največji odmerek na nalepki jemlje kot največja stopnja aplikacije, računano na osnovi površinskega območja vode v preskusni posodi. V vseh drugih primerih naj se uporabijo koncentracije, ki temeljijo na napovedih iz emisij v okolje. Treba je paziti, da se zagotovi vnos zadostne koncentracije preskusne snovi za opredelitev poti transformacije ter nastajanje in zmanjševanje produktov transformacije. V primerih, ko so koncentracije preskusne snovi blizu mejam detekcije na začetku študije in/ali kadar glavni produkti transformacije niso zlahka zaznavni ob navzočnosti 10 % stopnje aplikacije preskusne snovi, je morda treba uporabiti večje odmerke (npr. 10-krat). A če se uporabijo višje preskusne koncentracije, ne smejo imeti opaznega škodljivega učinka na mikrobno dejavnost sistema vode in usedline. Da bi dosegli stalno koncentracijo preskusne snovi v posodah različnih velikosti, je morda primerno razmisliti o prilagoditvi količine uporabljenega materiala na podlagi globine vodne kolone v posodi glede na globino vode na terenu (za katero se predvideva, da je 100 cm, vendar se lahko uporabijo druge globine). Glej Dodatek 4 za primer izračuna.

V idealnem primeru se preskusna snov uporabi kot vodna raztopina v vodni fazi preskusnega sistema. Če se temu ne da izogniti, je dovoljena uporaba manjših količin topil, ki se mešajo z vodo (npr. aceton, etanol), za nanos in porazdelitev preskusne snovi, vendar ne sme presegati 1 % v/v in ne sme imeti škodljivih učinkov na mikrobno dejavnost preskusnega sistema. Pri izdelavi vodne raztopine preskusne snovi je potrebna pazljivost, za zagotavljanje popolne homogenosti je morda primerna uporaba generatorskih kolon in predhodno mešanje. Po dodajanju vodne raztopine v preskusni sistem se priporoča nežno mešanje vodne faze, tako da se čim manj moti usedlina.

Ne priporoča se rutinska uporaba formuliranih pripravkov, ker lahko formulirane sestavine škodujejo porazdelitvi preskusne snovi in/ali produktov transformacije med vodno fazo in fazo usedline. Vendar je lahko uporaba formuliranega materiala ustrezna rešitev pri slabo topnih preskusnih snoveh.

Število inkubacijskih posod je odvisno od števila vzorčenj (glej oddelek 1.9.3). Treba je vključiti zadostno število preskusnih sistemov, tako da se lahko pri vsakem vzorčenju žrtvujeta dva sistema. Če se pri vsaki vodni usedlini uporabijo kontrolne enote, se ne smejo tretirati s preskusno snovjo. Kontrolne enote se lahko uporabljajo za določanje mikrobne biomase usedline in skupnega organskega ogljika v vodi in usedlini na koncu študije. Dve kontrolni enoti (to je po ena kontrolna enota iz vsake vodne usedline) se lahko uporabi za spremljanje potrebnih parametrov v usedlini in vodi med prilagoditvenim obdobjem (glej tabelo v oddelku 1.8.2.2). Dve dodatni kontrolni enoti je treba vključiti v primeru, če se preskusna snov nanese s pomočjo topila, da se izmeri škodljive učinke na mikrobno dejavnost preskusnega sistema.

([1]) Preskus z drugo koncentracijo je lahko koristen pri kemikalijah, ki pridejo v površinske vode po drugih vstopnih poteh in povzročijo znatno drugačne koncentracije, če se lahko manjša koncentracija dovolj natančno analizira.

▼B

1.9.3 **Trajanje preskusa in vzorčenje**

Trajanje poskusa normalno ne presega 100 dni (6) in naj se nadaljuje, dokler se ne vzpostavijo pot razgradnje in vzorec razporeditve vode/usedline ali dokler se 90 % preskusne snovi ne porabi s transformacijo in/ali izhlapevanjem. Število vzorčenj naj bo vsaj šest (vključno z ničelnim), z neobvezno predhodno študijo (glej oddelek 1.9.4), ki se uporabi za vzpostavitev ustreznega režima vzorčenja in trajanja preskusa, razen če je iz prejšnjih študij na voljo dovolj podatkov o preskusni snovi. Za hidrofobne preskusne snovi so lahko v začetnem obdobju študije potrebne dodatne točke vzorčenja zaradi določitve stopnje razporeditve med vodno fazo in fazo usedline.

Po ustreznem številu vzorčenj se vse inkubacijske posode (v ponovitvah) odstranijo za analizo. Usedlina in nad njo ležeča voda se analizirata posebej[15]. Površinska voda se previdno odstrani s čim manjšim motenjem usedline. Pri ekstrakciji in opredelitvi preskusne snovi in produktov transformacije je treba upoštevati ustrezne analitske postopke. Paziti je treba, da se odstrani material, ki se je morda adsorbiral na inkubacijsko posodo ali na povezovalne cevi, ki se uporabljajo za zajemanje hlapnih snovi.

1.9.4 **Neobvezni predhodni preskus**

Če se trajanje in režim vzorčenja ne moreta oceniti po drugih ustreznih študijah preskusne snovi, je lahko primeren neobvezni predhodni preskus, ki ga je treba izvesti z uporabo enakih preskusnih razmer, kakor so predlagane za dejansko študijo. O ustreznih poskusnih razmerah in rezultatih predhodnega preskusa, če se izvede, je treba na kratko poročati.

1.9.5 **Meritve in analiza**

Koncentracijo preskusne snovi in produktov transformacije je treba pri vsaki ponovitvi vzorčenja izmeriti in o njej poročati (o koncentraciji in o uporabljenem odstotku). Na splošno je treba ugotoviti produkte transformacije, ki se pri katerem koli vzorčenju zaznajo pri > 10 % uporabljene radioaktivnosti v skupnem sistemu voda-usedlina, razen če ni upravičeno utemeljeno drugače. Tudi produkte transformacije, pri katerih se koncentracije med študijo nenehno povečujejo, je treba upoštevati pri ugotavljanju, tudi če njihove koncentracije ne presegajo zgornjih omejitev, ker lahko označujejo obstojnost. Slednje je treba upoštevati glede na vsak primer posebej in v poročilu podati utemeljitev.

O rezultatih iz sistemov zajemanja plinov/hlapnih snovi (CO_2 in drugih, to je hlapnih organskih spojin) je treba poročati za vsako ponovitev vzorčenja. Poročati je treba o stopnjah mineralizacije. O neizločljivih (vezanih) ostankih v usedlini je treba poročati za vsako točko vzorčenja.

▼B

2. **PODATKI**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Skupno masno bilanco ali izkoristek (glej oddelek 1.7.1) dodane radioaktivnosti je treba izračunati za vsako ponovitev vzorčenja. O rezultatih se poroča v obliki odstotka dodane radioaktivnosti. O porazdelitvi radioaktivnosti med vodo in usedlino se poroča v obliki koncentracij in odstotkov za vsako ponovitev vzorčenja.

Razpolovna doba, DT_{50} in po potrebi DT_{75} in DT_{90} preskusne snovi se izračunajo skupaj z njihovim intervalom zaupanja (glej oddelek 1.7.3). Informacije o stopnji razpršitve preskusne snovi v vodi in usedlini se lahko dobijo z uporabo ustreznih ocenjevalnih orodij. Te so lahko vse od uporabe psevdo kinetike prvega reda, empiričnih tehnik prilagajanja krivulje, pri katerih se uporabljajo grafične ali številčne rešitve do bolj zapletenega ocenjevanja, na primer z uporabo eno- ali večprekatnih modelov. Nadaljnji podatki so na voljo v ustrezni objavljeni literaturi (35) (36) (37).

Vsi pristopi imajo svoje prednosti in slabosti in se znatno razlikujejo po sestavljenosti. Predpostavka kinetike prvega reda je lahko prevelika poenostavitev procesov razgradnje in porazdelitve, a kadar je mogoče, daje pojem (stopnjo konstante ali razpolovno dobo), ki je lahko razumljiv in ima vrednost pri simulacij skem modeliranju in izračunavanju predvidenih okoljskih koncentracij. Empirčni pristopi ali linearne transformacije se lahko bolje ujemajo s krivuljami podatkov in zato omogočajo boljše ocene razpolovnih dob, vrednosti DT_{50} in po potrebi DT_{75} in DT_{90}. Uporaba izpeljanih konstant pa je omejena. Modeli s prekati lahko dajo številne uporabne konstante vrednosti pri ocenjevanju tveganja, ki opisujejo stopnjo razgradnje v različnih prekatih in porazdelitev kemikalije. Uporabljajo se lahko tudi za ocenjevanje stopnje konstant pri oblikovanju in razgradnji glavnih produktov transformacije. V vseh primerih mora biti izbrana metoda utemeljena in mora izvajalec poskusa grafično in/ali statistično prikazati, zakaj je izbira dobra.

3. **POROČANJE**

3.1 POROČILO O PRESKUSU

Poročilo mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna snov:

— splošno ime, kemijsko ime, številko po CAS, strukturno formulo (z navedbo položaja oznak(e), kadar se uporabi radioaktivno označeni material) in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— čistost (nečistoče) preskusne snovi,

— radiokemijsko čistost označene kemikalije in molarno dejavnost (kjer je primerno).

▼B

Referenčne snovi:

— kemijsko ime in strukturo referenčnih snovi, uporabljenih za opredelitev in/ali določitev produktov transformacije.

Preskusne usedline in vode:

— lokacijo in opis mest(a) vzorčenja vodnih usedlin, vključno, če je mogoče, s preteklo kontaminacijo,

— vse informacije v zvezi z odvzemanjem, shranjevanjem (če se izvaja) in prilagoditvijo sistemov vode in usedlin,

— značilnosti vzorcev vode in usedlin, ki so naštete v tabeli v oddelku 1.8.2.2.

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni sistem (npr. pretočni, biometrični, način prezračevanja, metodo mešanja, količino vode, maso usedline, gostoto obeh plasti, vode in usedline, mere preskusnih posod itd.),

— uporabo preskusne snovi v preskusnem sistemu: uporabljeno preskusno koncentracijo, število ponovitev in način uporabe kontrol preskusne snovi (npr. morebitno uporabo topila) itd.,

— inkubacijsko temperaturo,

— število vzorčenj,

— metode ekstrakcije in učinkovitost, pa tudi analitske metode in meje detekcije,

— metode opredelitve/določitve produktov transformacije,

— odstopanja od preskusnega protokola ali preskusnih razmer med študijo.

Rezultati:

— vrednosti surovih podatkov reprezentativnih analiz (vsi surovi podatki se morajo shraniti v GLP arhivu),

— ponovljivost in občutljivost uporabljenih analitskih metod,

— stopnje izkoristka (vrednosti v % za veljavno študijo so podane v oddelku 1.7.1),

— tabele rezultatov, izražene v % uporabljenega odmerka in v $mg \cdot kg^{-1}$ v vodi, usedlini in skupnem sistemu (samo %) za preskusno snov in, če je primerno, za produkte transformacije in neizločljivo radioaktivnost,

— masno bilanco med potekom in na koncu študij,

— grafično predstavitev transformacije v vodi in frakcijah usedlin ter v skupnem sistemu (vključno z mineralizacijo),

— stopnje mineralizacije,

▼B

— razpolovno dobo, vrednosti DT_{50} in po potrebi DT_{75} in DT_{90} za preskusno snov in, kadar je primerno, za glavne produkte transformacije, vključno z intervalom zaupanja v vodi, usedlini in skupnem sistemu,

— oceno kinetike transformacije za preskusno snov in, kadar je primerno, za glavne produkte transformacije,

— predlagane poti transformacije, kadar je primerno,

— razpravo o rezultatih.

4 **LITERATURA**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5–1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Nemčija.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). Nizozemska.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. Združeno kraljestvo.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Kanada. Str. 35–37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of poly cyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631–637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661–667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038–1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3–4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858–2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G, van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329–338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197–203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13–21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850–857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527–1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499–1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597–3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961–968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 39, 187–203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47–60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, str. 1349–1354.

▼B

DODATEK 1

NAPOTKI ZA AEROBNE IN ANAEROBNE PRESKUSNE SISTEME

Aerobni preskusni sistem

Aerobni preskusni sistem, opisan v tej preskusni metodi, je sestavljen iz aerobne vodne plasti (tipične koncentracije kisika so v razponu od 7 do 10 $mg \cdot 1^{-1}$) in plasti usedline, aerobne na površini in anaerobne pod površino (tipični povprečni redoks potenciali (Eh) v anaerobni coni usedline so v razponu od –80 do –190 mV). V vsaki inkubacijski enoti se vlažen zrak spusti preko površine vode, da se ohrani dovolj kisika v volumnu nad vzorcem.

Anaerobni preskusni sistem

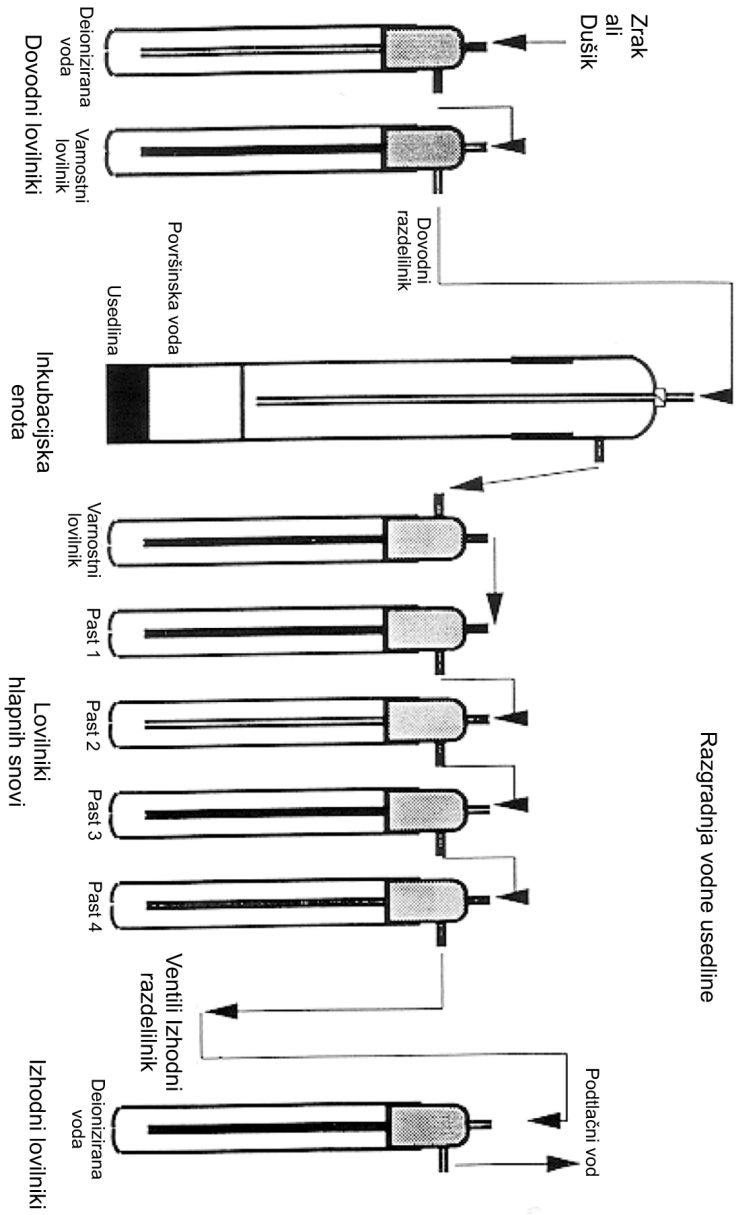
Pri anaerobnem preskusnem sistemu je preskusni postopek v bistvu enak kakor je opisan za aerobni sistem, le da se preko površine vode v vsaki inkubacijski enoti spusti dušik za ohranjanje dušika v volumnu nad vzorcem. Usedlina in voda se štejeta za anaerobna, dokler je redoks potencial (Eh) nižji od –100 mV.

Pri anaerobnem preskusu ocenjevanje mineralizacije vključuje meritve vsebovanega ogljikovega dioksida in metana.

▼B

DODATEK 2

PRIMER PLINSKE PRETOČNE NAPRAVE

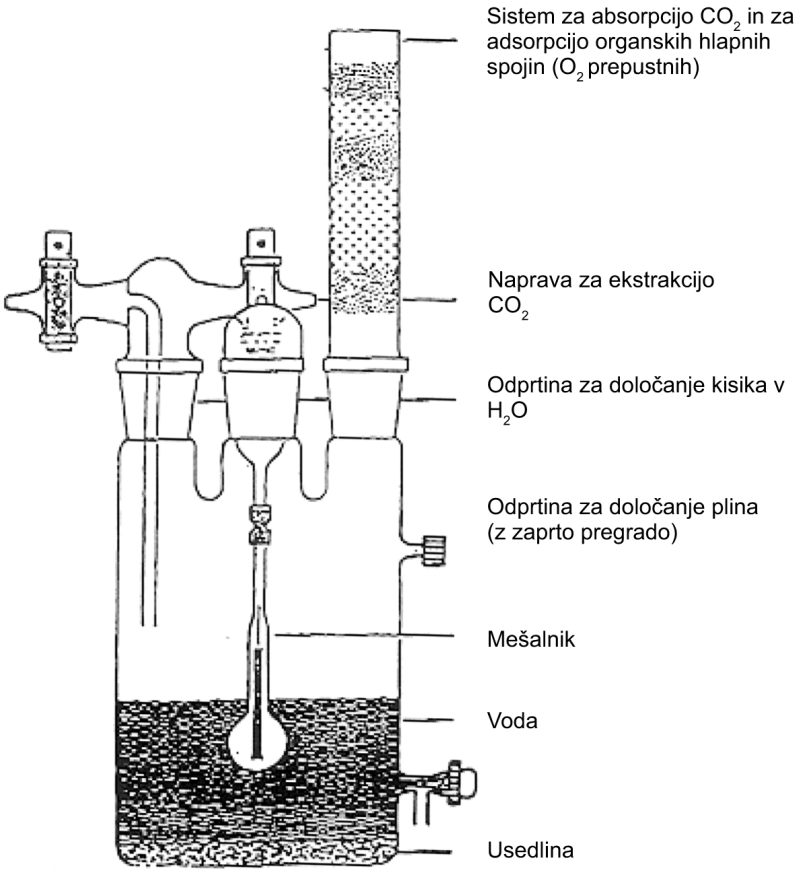


Varnostna past, prazna
Past 1:
etileneglikol za lovljenje organskih hlapnih snovi
Past 2:
Žveplena kislina 0,1 M za lovljenje alkalnih hlapnih snovi
Pasti 3 & 4:
Natrijev hidroksid 2M za lovljenje CO_2 in drugih kislih hlapnih snovi

▼B

DODATEK 3

PRIMER BIOMETRIČNE NAPRAVE



Magnetni mešalnik

▼B

DODATEK 4

PRIMER IZRAČUNA ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE PRESKUSNE SNOVI V PRESKUSNIH POSODAH

Notranji premer cilindra:	= 8 cm
Globina vodne kolone brez usedline:	= 12 cm
Površina: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Stopnja aplikacije: 500 g preskusne snovi/ha ustreza 5 $\mu g/cm^2$	
Skupno µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Prilagojena količina glede na globino 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Volumen vodne kolone: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Koncentracija v vodi: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml ali 50 µg/l

▼M1

C.25 AEROBNA MINERALIZACIJA V POVRŠINSKI VODI – SIMULACIJSKI PRESKUS BIORAZGRADNJE

1 METODA

Ta preskusna metoda je enakovredna OECD TG 309 (2004) (1).

1.1 UVOD

Namen tega preskusa je izmeriti časovni potek biorazgradnje preskusne snovi z nizko koncentracijo v aerobni naravni vodi in opažanja količinsko opredeliti v obliki enačbe kinetike. Ta simulacijski preskus je laboratorijski preskus serije stresanih bučk za določitev hitrosti aerobne biorazgradnje organskih snovi v vzorcih naravne površinske vode (sladke, brakične ali morske). Temelji na ISO/DIS 14592–1 (2) in vključuje tudi elemente iz preskusnih metod C.23 in C.24 (3)(4). Pri preskušanjih, ki trajajo dolgo, lahko neobvezno polkontinuirano delovanje zamenja serije, da se prepreči razpad mikrokozma. Glavni cilj simulacijskega preskusa je določitev mineralizacije preskusne snovi v površinski vodi in mineralizacija predstavlja osnovo za izražanje kinetike razgradnje. Vendar je neobvezni sekundarni cilj preskusa pridobiti podatke o primarni razgradnji in o tvorbi poglavitnih produktov transformacije. Določitev produktov transformacije in po možnosti količinska opredelitev njihovih koncentracij, sta zlasti pomembna za snovi, ki se zelo počasi mineralizirajo (npr. ko razpolovna doba skupnega ostanka ^{14}C presega 60 dni). Običajno se za določitev in količinsko opredelitev produktov transformacije uporabijo višje koncentracije preskusne snovi (npr, > 100 μg/l) zaradi analitičnih omejitev.

Nizka koncentracija v tem preskusu pomeni koncentracijo (npr. manj kot 1 μg/l do 100 μg/l), ki je dovolj nizka, da se v preskusu zagotovi biorazgradna kinetika, ki odraža biorazgradno kinetiko, kakršna se pričakuje v okolju. V primerjavi s skupno maso biorazgradljivih substratov iz ogljika, ki so na voljo v naravni vodi, uporabljeni v preskusu, bo preskusna snov v nizki koncentraciji služila kot sekundarni substrat. Ta pomeni, da je pričakovana biorazgradna kinetika prvega reda (kinetika „brez rasti“) in da se lahko preskusna snov razgradi s „sopresnovo“. Kinetika prvega reda pomeni, da je hitrost razgradnje (mg/l/dan) sorazmerna s koncentracijo substrata, ki se s časom znižuje. Pri kinetiki pravega prvega reda je konstanta specifične hitrosti razgradnje k neodvisna od časa in koncentracije. To pomeni, da se k znatno ne spreminja med potekom poskusa in se ne spremeni, če se med poskusi koncentracija doda. Po opredelitvi je konstanta specifične hitrosti razgradnje enaka relativni spremembi koncentracije s časom: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Čeprav v predpisanih pogojih običajno pričakujemo kinetiko prvega reda, so določenih okoliščinah bolj primerne druge kinetike. Odstopanja od kinetike prvega reda lahko npr. opazimo, če hitrost biopretvorbe namesto hitrosti biološke reakcije omejuje pojav prenosa mase, kot je hitrost difuzije. Vendar lahko podatke skoraj vedno opišemo s psevdo kinetiko prvega reda s sprejeto konstanto odvisno od koncentracije.

▼**M1**

Pred preskušanjem morajo biti na voljo podatki od biorazgradljivosti preskusne snovi v višjih koncentracijah (npr. v standardnih presejalnih preskusih) kot tudi podatki o abiotski razgradljivosti, produktih transformacije in pomembnih fizikalno-kemijskih lastnostih, da se omogoči načrtovanje poskusa in interpretacija rezultatov. Določitev popolne biorazgradljivosti omogočajo preskusne snovi, označene s ^{14}C, in določevanje fazne porazdelitve ^{14}C na koncu preskusa. Če se uporablja neoznačena preskusna snov, se lahko popolna biorazgradnja oceni le, če se preskuša višja koncentracija in če so znani vsi poglavitni produkti transformacije.

1.2 OPREDELITVE

Primarna biorazgradnja: Strukturna sprememba (transformacija) kemijske snovi z mikroorganizmi, pri čemer izgine kemijska identiteta.

Funkcionalna biorazgradnja: Strukturna sprememba (transformacija) kemijske snovi z mikroorganizmi, pri čemer izgine specifična lastnost.

Popolna aerobna biorazgradnja: Razgradnja kemijske snovi z mikroorganizmi v prisotnosti kisika v ogljikov dioksid in mineralne soli katerih koli drugih elementov, ki so prisotni, (mineralizacija) ter nastanek nove biomase in organskih produktov mikrobne biosinteze.

Mineralizacija: Razgradnja kemijske ali organske snovi z mikroorganizmi v prisotnosti kisika v ogljikov dioksid, vodo in mineralne soli katerih koli drugih elementov, ki so prisotni.

Faza prilagajanja: Čas, ki preteče od začetka preskusa, dokler se razgradni mikroorganizmi ne prilagodijo in dokler se stopnja biorazgradnje kemijske ali organske snovi ne poveča do zaznavne ravni (npr. 10 % največje teoretične biorazgradnje ali manj, odvisno od točnosti merilne tehnike).

Največja stopnja biorazgradnje: Stopnja biorazgradnje kemijske ali organske snovi v preskusu v odstotkih, nad katero v preskusu ni bilo dodatne biorazgradnje.

Primarni substrat: Zbirka naravnih virov ogljika in energije, ki omogočajo rast in ohranjanje mikrobne biomase.

Sekundarni substrat: Sestavina substrata, ki je prisotna v tako nizki koncentraciji, da pri svoji razgradnji mikroorganizmom, zmožnim razgradnje te snovi, prinese le nepomembno količino ogljika in energije v primerjavi s količino ogljika in energije, ki jo prinese razgradnja sestavin glavnenega substrata (primarnih substratov).

Konstanta hitrosti razgradnje: Konstanta kinetike prvega reda ali psevdo kinetike prvega reda k (d^{-1}), ki kaže hitrost razgradnje v procesu. V serijskem poskusu se k oceni iz začetnega dela krivulje razgradnje, ki se izdela po koncu faze prilagajanja.

▼M1

Razpolovna doba, $t_{1/2}$ (d): Izraz, ki opisuje hitrost reakcije prvega reda. Razpolovna doba je čas, ki ustreza znižanju koncentracije za faktor 2. Razpolovna doba in konstanta hitrosti razgradnje sta v zvezi v enačbi $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Razpolovna doba razgradnje, DT_{50} (d): Izraz, s katerim se količinsko opredeli izid preskusov biorazgradnje. Razpolovna doba razgradnje je čas, vključno s fazo prilagajanja, ki je potreben za doseganje 50-odstotne biorazgradnje.

Meja zaznavnosti (LOD) in meja količinske opredelitve (LOQ): Meja zaznavnosti (LOD) je koncentracija snovi, pod katero identitete snovi ni možno razlikovati od analitičnih artefaktov. Meja količinske opredelitve (LOQ) je koncentracija snovi, pod katero koncentracije ni možno določiti s sprejemljivo natančnostjo.

Raztopljeni organski ogljik (DOC): Tisti del organskega ogljika v vzorcu vode, ki ga ni mogoče odstraniti z navedeno separacijo faz, npr. s centrifugiranjem pri 40 000 ms^{-2} za 15 min ali z membransko filtracijo z membranami, ki imajo pore s premerom od 0,2 μm do 0,45 μm.

Skupna aktivnost organskega ^{14}C (TOA): Skupna aktivnost ^{14}C, odvisna od organskega ogljika.

Aktivnost raztopljenega organskega ^{14}C (DOA): Skupna aktivnost ^{14}C, odvisna od raztopljenega organskega ogljika.

Aktivnost organskega ^{14}C v delcih (POA): Skupna aktivnost ^{14}C, odvisna od organskega ogljika v delcih.

1.3 UPORABNOST PRESKUSA

Ta simulacijski preskus se uporablja za nehlapne ali rahlo hlapne organske spojine, ki se preskušajo v nizkih koncentracijah. Če se uporabljajo bučke odprte proti atmosferi (npr. zamašene z vato) se snovi s konstantami Henryevega zakona manj od približno 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (približno 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) lahko štejejo za praktično nehlapne. Z uporabo zaprtih bučk z nadprostorom je možno preskušati rahlo hlapne snovi (s konstantami Henryevega zakona < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ ali < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) brez izgub iz preskusnega sistema. Če se pri odstranjevanju CO_2 ne upoštevajo ustrezni previdnostni ukrepi, lahko to povzroči izgubo snovi, označenih s ^{14}C. V takšnih primerih bo morda treba zajeti CO_2 v notranjo absorpcijsko posodo z alkalijskimi snovmi ali uporabiti zunanji absorpcijski sistem za CO_2 (neposredno določevanje $^{14}CO_2$; glejte Prilogo 3). Za določevanje kinetike biorazgradnje morajo biti koncentracije preskusne snovi pod lastno topnostjo v vodi. Kljub temu je treba opozoriti, da so lahko vrednosti topnosti v vodi iz literature znatno višje od topnosti preskusne snovi v naravnih vodah. Neobvezno se lahko določi topnost še zlasti slabo vodotopnih preskusnih snovi z uporabo preskušanih naravnih vod.

Ta metoda se lahko uporabi za simuliranje biorazgradnje v površinskih vodah brez grobih delcev (pelagični preskus) ali v motnih površinskih vodah, ki so blizu mejne ploskve med vodo in sedimentom (preskus suspendiranega sedimenta).

▼M1

1.4 PRINCIP PRESKUSNE METODE

Preskus se opravi v seriji z inkubacijo preskusne snovi bodisi s samo površinsko vodo (pelagični preskus) bodisi s površinsko vodo z dodanimi suspendiranimi trdnimi snovmi/sedimentom v koncenctraciji 0,01 do 1 g/l suhe mase (preskus suspendiranega sedimenta), da se simulira vodno telo s suspendiranim ali resuspendiranim sedimentom. Za večino površinskih vod je značilna koncentracija suspendiranih trdnih snovi/sedimenta na spodnji meji navedenega razpona. Preskusne bučke se inkubirajo v temi pri temperaturi okolja v aerobnih pogojih in ob agitaciji. Za določitev kinetike biorazgradnje je treba uporabiti najmanj dve različni koncentraciji preskusne snovi. Koncentraciji se morata med seboj razlikovati za faktor od 5 do 10. Koncentraciji morata predstavljati pričakovano območje koncentracij v okolju. Najvišja koncentracija preskusne snovi ne sme preseči 100 μg/l, vendar imajo kot najvišje koncentracije prednost preskusne koncentracije pod 10 μg/l ali manj, s čimer se zagotovi, da biorazgradnja sledi kinetiki prvega reda. Najnižja koncentracija ne sme preseči 10 μg/l, vendar imajo kot najnižje koncentracije prednost preskusne koncentracije od 1 do 2 μg/l ali manj kot 1 μg/l. Običajno je mogoče zadostno analizo tako nizkih koncentracij doseči s komercialno dostopnimi snovmi, označenimi s ^{14}C. Če se preskusna snov vnese v koncentraciji $\leq$ 100 μg/l, je zaradi analitskih omejitev pogosto nemogoče izmeriti koncentracijo preskusne snovi z zahtevano točnostjo (glejte drugi odstavek oddelka 1.7.2). Za določitev in količinsko opredelitev poglavitnih produktov transformacije ali kadar ni na voljo specifična analitska metoda z nizko mejo zaznavnosti, se lahko uporabijo višje koncentracije preskusne snovi (> 100 μg/l ali včasih > 1 mg/l). Če se preskušajo visoke koncentracije preskusne snovi, morda ne ni možno uporabiti rezultatov za oceno konstante razgradnje prvega reda in razpolovne dobe, saj razgradnja ne bo sledila kinetiki prvega reda.

Razgradnjo je treba spremljati v ustreznih časovnih razmikih z merjenjem bodisi preostalega ^{14}C bodisi preostale koncentracije preskusne snovi, če se uporabi specifična kemijska analiza. Označevanje najbolj obstojnega dela molekule s ^{14}C omogoča določevanje skupne mineralizacije. Označevanje manj obstojnega dela molekule s ^{14}C in specifična analiza pa omogočata vrednotenje le primarne biorazgradnje. Vendar ni nujno, da najbolj obstojen del molekule obsega relevantno funkcionalno področje molekule (področje, ki je odvisno od specifične lastnosti, npr. strupenosti, bioakumulacije itn.). V tem primeru je morda treba uporabiti preskusno snov, ki je označena s ^{14}C v funkcionalnem delu, da je mogoče slediti odstranjevanju specifične lastnosti.

1.5 PODATKI O PRESKUSNI SNOVI

V tem preskusu je mogoče uporabiti radioaktivno označene in neoznačene preskusne snovi. Priporočljiva je tehnika označevanja s ^{14}C, pri čemer se običajno označi(-jo) najobstojnejši del(-i) molekule (glejte tudi oddelek 1.4). Za snovi, ki vsebujejo več kot en aromatski obroč, enega ali več ogljikovih atomov v vsakem obroču, je označevanje s ^{14}C prednostno. Poleg tega ima prednost označevanje enega ali več ogljikovih atomov s ^{14}C na obeh straneh lahko cepljivih vezi. Kemijska in/ali radiokemijska čistota preskusne snovi mora biti > 95 %. Pri radioaktivno označenih snoveh ima prednost specifična aktivnost približno 50 μCi/mg (1,85 MBq) ali več, kar omogoči merjenje ^{14}C v preskusih, ki vsebujejo nizke začetne koncentracije. Na voljo morajo biti naslednji podatki o preskusni snovi:

▼M1

— topnost v vodi [metoda A.6],

— topnost v organskem topilu ali organskih topilih (za snovi, ki se vnesejo s topilom ali imajo majhno topnost v vodi),

— disociacijska konstanta (pKa), če je snov nagnjena k protonaciji ali deprotonaciji [OECD TG 112] (5),

— parni tlak [metoda A.4] in konstanta Henryevega zakona,

— kemijska obstojnost v vodi v temi (hidroliza) [metoda C.7].

V primeru preskušanja slabo vodotopnih snovi v morski vodi je morda uporabno poznati konstanto izsoljevanja (ali „Setschenowovo konstanto“) K^s, ki je določena z enačbo: log (S/S') = K^s C_m, kjer pomeni: S – topnost snovi v sladki vodi, S' – topnost snovi v morski vodi in C_m – molarnost soli.

Če se preskus opravlja kot „preskus suspendiranega sedimenta“, morajo biti na voljo tudi naslednji podatki:

— porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda [metoda A.8],

— adsorpcijski koeficient [metoda C.18].

Drugi uporabni podatki so med drugim:

— koncentracija v okolju, če je znana ali ocenjena,

— strupenost preskusne snovi za mikroorganizme [metoda C.11],

— lahka in/ali inherentna biorazgradljivost [metode C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— aerobna ali anaerobna biorazgradljivost v raziskavah transformacije v prsti in sedimentu/vodi [metode C.23, C.24].

1.6 REFERENČNA SNOV

Kot referenčno snov je treba uporabiti snov, ki se običajno lahko razkraja v aerobnih pogojih (npr. anilin ali natrijev benzoat). Pričakovani časovni interval razgradnje anilina in natrijevega benzoata je ponavadi manj kot 2 tedna. Namen referenčnih snovi je zagotoviti, da je mikrobna aktivnost v preskusni vodi v določenih mejah, tj. da voda vsebuje aktivno mikrobno populacijo.

▼M1

1.7 MERILA KAKOVOSTI

1.7.1 **Izkoristek**

Neposredno po dodatku preskusne snovi je treba vsako začetno preskusno koncentracijo najmanj v dveh vzorcih preveriti z meritvami aktivnosti ^{14}C ali s kemijskimi analizami v primeru neoznačenih snovi. S tem se pridobijo podatki o uporabnosti in ponovljivosti analitske metode in podatki o homogenosti porazdelitve preskusne snovi. Običajno se v naknadnih analizah podatkov namesto nazivne koncentracije uporablja izmerjena začetna aktivnost ^{14}C ali koncentracija preskusne snovi, saj se s tem upoštevajo izgube zaradi sorpcije in napak pri odmerjanju. Za snovi, označene s ^{14}C, izkoristek na koncu preskusa daje masna bilanca (glejte zadnji odstavek oddelka 1.8.9.4). V idealnem primeru bi morala biti bilanca radioaktivne mase v območju od 90 % do 110 %, vendar za neoznačene preskusne snovi analitska točnost privede do začetnega izkoristka med 70 % in 110 %. Ta območja se morajo šteti za ciljna in ne kot kriteriji za sprejemljivost preskusa. Neobvezno se lahko za preskusno snov določi analitska točnost pri nižji koncentraciji kot je začetna koncentracija in tudi za poglavitne produkte transformacije.

1.7.2 **Ponovljivost in občutljivost analitske metode**

Ponovljivost analitske metode (vključno z učinkovitostjo začetne ekstrakcije) za količinsko opredelitev preskusne snovi in proizvodov transformacije, če je smiselno, je treba preveriti s petimi ponovitvami analiz posameznih ekstraktov površinske vode.

Meja zaznavnosti (LOD) analitske metode za preskusno snov in za produkte transformacije mora biti, če je možno, vsaj 1 % začetne vnesene količine v preskusnem sistem. Meja količinske opredelitve (LOQ) mora biti enaka ali manj od 10 % vnesene koncentracije. Kemijske analize številnih organskih snovi in njihovih produktov transformacije pogosto zahtevajo vnos relativno visoke koncentracije preskusne snovi, tj. > 100 μg/l.

1.8 OPIS PRESKUSNE METODE

1.8.1 **Oprema**

Preskus se lahko opravlja v stožčastih ali valjastih bučkah ustrezne prostornine (npr. 0,5 ali 1,0 litra), ki so zamašene z zamaški iz silikona ali kavčuka. Preskus se lahko opravlja tudi v serumskih bučkah z zaporkami, ki tesnijo CO_2 (npr. septumi z butilnega kavčuka). Druga možnost je izvedba preskusa z uporabo več buč, pri čemer se v vzorčnih časovnih razmikih odvzameta najmanj dve celi bučki (glejte zadnji odstavek oddelka 1.8.9.1). Za nehlapne preskusne snovi, ki niso radioaktivno označene, plinotesni zamaški ali zaporke niso potrebne; primerni so vatirani čepi, ki preprečujejo onesnaženje iz zraka (glejte drugi odstavek oddelka 1.8.9.1). Rahlo hlapne snovi je treba preskusiti v sistemu biometričnega tipa z blagim mešanjem vodne gladine. Zagotoviti je treba, da ne pride do bakterijskega onesnaženja. Neobvezno se lahko posode pred uporabo sterilizirajo s segrevanjem ali avtoklaviranjem. Poleg naštetega, je potrebna naslednja standardna laboratorijska oprema:

— stresalna miza ali magnetni mešalniki za neprekinjeno agitacijo preskusnih buč,

▼M1

— centrifuga,

— pH-meter,

— turbidimeter za nefelometrične meritve motnosti,

— pečica ali mikrovalovna pečica za določitev suhe mase,

— oprema za membransko filtracijo,

— avtoklav ali pečica za toplotno sterilizacijo steklovine,

— oprema za ravnanje s snovmi, označenimi s ^{14}C,

— oprema za količinsko opredelitev aktivnosti ^{14}C v vzorcih iz raztopin za lovljenje CO_2 in, če je treba, iz vzorcev sedimenta,

— analitska oprema za določevanje preskusne (in referenčne) snovi, če se uporablja kemijska analiza (npr. plinski kromatograf, visokotlačni tekočinski kromatograf).

1.8.2 **Založne raztopine preskusne snovi**

Za pripravo založnih raztopin preskusne in referenčne snovi je treba uporabiti deionizirano vodo (glejte prvi odstavek oddelka 1.8.7). Deionizirana voda mora biti brez snovi, ki so lahko strupene za mikroorganizme. Ne sme vsebovati več kot 1 mg/l raztopljenega organskega ogljika (DOC) (6).

1.8.3 **Odvzem in prevoz površinske vode**

Mesto vzorčenja površinske vode je treba izbrati v skladu z namenom preskusa v dani situaciji. Pri izbiranju mesta vzorčenja je treba upoštevati preteklost morebitnih kmetijskih, industrijskih ali domačih vnosov. Če je bilo vodno okolje v zadnjih štirih letih onesnaženo s preskusno snovjo ali njenimi strukturnimi analogi, se ne sme uporabiti za odvzem preskusne vode, razen če je raziskovanje hitrosti razgrajevanja na predhodno izpostavljenih mestih izrecen namen raziskovalca. Na mestu vzorčenja je treba izmeriti pH in temperaturo vode. Zabeležiti je treba tudi globino vzorčenja in izgled vzorca vode (npr. barva in motnost) (glejte oddelek 3). Izmeriti je treba koncentracijo kisika in/ali redoks potencial v vodi ter v površinskem sloju sedimenta, da se dokažejo aerobni pogoji, razen če je to očitno na podlagi izgleda in preteklih izkušenj na mestu vzorčenja. Površinsko vodo je treba prenesti v temeljito očiščeni posodi. Med prevozom temperatura vzorca ne sme bistveno preseči temperature, ki se uporablja med preskusom. Če trajanje prevoza preseže 2 do 3 ure, je priporočljivo ohlajanje na 4 °C med prevozom. Vzorec vode ne sme zamrzniti.

▼M1

1.8.4 **Shranjevanje in priprava površinske vode**

Preskus je treba po možnosti začeti v enem dnevu po odvzemu vzorca. Trajanje shranjevanja vode, kadar je potrebno, je treba čimbolj skrajšati. V nobenem primeru pa ne sme preseči 4 tednov. Do uporabe je treba vzorec vode hraniti pri 4 °C z aeracijo. Pred uporabo je treba odstraniti grobe delce, npr. s filtracijsko skozi najlonski filter z velikostjo mreže približno 100 μm ali skozi grobi filter papir oz. s sedimentacijo.

1.8.5 **Priprava vode z dodanim sedimentom (neobvezno)**

Za preskus suspendiranega sedimenta je treba v bučke, ki vsebujejo naravno vodo (filtrirano za odstranitev grobih delcev, kakor je opisano v razdelku 1.8.4), dodati površinski sediment, da nastane suspenzija. Koncentracija suspendiranih trdnih snovi mora biti med 0,01 in 1 g/l. Površinski sediment mora izvirati iz istega mesta vzorčenja kot vzorec vode. Odvisno od posameznega vodnega okolja je možno opredeliti površinski sediment kot sediment z visoko vsebnostjo organskega ogljika (2,5–7,5 %) in fino teksturo ali kot sediment z nizko vsebnostjo organskega ogljika (0,5–2,5 %) in grobo teksturo (3). Površinski sediment se lahko pripravi po naslednjem postopku: neposredno po vzorčenju se s cevko iz prosojne plastične mase izvleče več sredic sedimenta, odreže zgornje aerobne plasti (od površine do globine največ 5 mm), nato pa se sredice združijo. Dobljeni vzorec sedimenta je treba prenesti v posodi z dovolj velikim zračnim nadprostorom, da je sediment v aerobnih pogojih (če trajanje prevoza preseže 2 do 3 ure, je potrebno ohlajanje na 4 °C). Vzorec sedimenta je treba suspendirati v preskusni vodi v razmerju 1:10 in do uporabe hraniti pri 4 °C z aeracijo. Trajanje shranjevanja sedimenta, kadar je potrebno, je treba čimbolj skrajšati. V nobenem primeru pa ne sme preseči 4 tednov.

1.8.6 **Polkontinuiran postopek (neobvezen)**

Če je potrebno dlje časa trajajoče prilagajanje preden je mogoče izmeriti znatno razgradnjo preskusne snovi, bo morda potrebna daljša inkubacija (več mesecev). Če je to znano iz predhodnega preskušanja snovi, se lahko preskus začne s polkontinuiranim postopkom, ki omogoča obdobno obnavljanje dela preskusne vode ali suspenzije (glejte Prilogo 2). Namesto tega se lahko običajni serijski preskus spremeni v polkontinuirani postopek, če v približno 60 dneh ne pride do razgradnje preskusne snovi v serijskem postopku (glejte drugi odstavek oddelka 1.8.8.3).

1.8.7 **Dodajanje preskusne (ali referenčne) snovi**

Za snovi z veliko topnostjo v vodi (> 1 mg/l) in majhno hlapnostjo (konstante Henryevega zakona < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ ali < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) se lahko pripravi založna raztopina v deionizirani vodi (glejte oddelek 1.8.2). Ustrezni volumni založne raztopine se lahko dolivajo v preskusne posode, da se doseže želena koncentracija. Volumen kakršne koli dodane založne raztopine mora biti najmanjši praktični volumen (< 10 % končnega volumna tekočine, če je možno). Drugačen postopek je raztapljanje preskusne snovi v večjem volumnu preskusne vode, kar je morda lahko alternativni postopek namesto uporabe organskih topil.

▼M1

Če se temu ne da izogniti, je treba založne raztopine nehlapnih snovi s slabo topnostjo v vodi pripraviti s hlapnim organskim topilom, vendar količina topila, dodanega v preskusni sistem, ne sme presegati 1 % v/v in ne sme imeti škodljivih učinkov na mikrobno dejavnost. Topilo ne sme vplivati na obstojnost preskusne snovi v vodi. Topilo je treba zmanjšati na izjemno majhno količino, tako da bistveno ne poveča koncentracije DOC v preskusni vodi ali suspenziji. To je treba preveriti z analizo, specifično za snov, ali, če je možno, analizo DOC (6). Zelo veliko pozornosti je treba posvetiti omejevanju količine prenesenega topila na zares potrebno količino. Ravno tako natančno pa je treba preveriti, da se količina preskusne snovi lahko raztopi v končnem volumnu preskusne vode. Uporabijo se lahko druge tehnike za vnos preskusne snovi v preskusne posode, kot so opisane v (7) in (8). Kadar se za vnos preskusne snovi uporablja organsko topilo, je treba kontrolne vzorce s topilom, ki vsebujejo preskusno vodo (brez dodatkov), in preskusno vodo z dodatkom referenčne snovi obdelati podobno kot aktivne preskusne posode z dodatno preskusno snovjo v topilu kot nosilcu. Namen kontrolnih vzorcev s topilom je preveriti možne neželene učinke topila na mikrobno populacijo, kar se pokaže z razgradnjo referenčne snovi.

1.8.8 **Preskusni pogoji**

1.8.8.1 *Preskusna temperatura*

Inkubacijo je treba izvajati v temi (prednostno) ali v difuzni svetlobi pri kontrolirani (± 2 °C) temperaturi. Temperatura je lahko temperatura na terenu ali standardna temperatura 20–25 °C. Temperatura na terenu je lahko bodisi dejanska temperatura na mestu vzorčenja v času vzorčenja ali povprečna terenska temperatura na mestu vzorčenja.

1.8.8.2 *Agitacija*

Zagotoviti je treba agitacijo z neprekinjenim stresanjem ali mešanjem, da se delci in mikroorganizmi ohranjajo v suspenziji. Agitacija tudi olajša prenos kisika iz nadprostora v tekočino, da se lahko zadostno ohranjajo aerobni pogoji. Bučke se postavijo na stresalno mizo (stresanje s hitrostjo približno 100 o/min) ali pa se uporabi magnetno mešanje. Agitacija mora biti neprekinjena. Kljub temu, mora biti stresanje ali mešanje čimbolj nežno, da se še ohranja homogena suspenzija.

1.8.8.3 *Trajanje preskusa*

Trajanje preskusa običajno ne sme preseči 60 dni, razen če se uporabi polkontinuiran postopek z obdobnim obnavljanjem preskusne suspenzije (glejte oddelek 1.8.6 in Prilogo 2). Če pa se razgradnja preskusne snovi začne v prvih 60 dneh, je možno serijski preskus podaljšati do največ 90 dni. Razgradnjo je treba spremljati v ustreznih časovnih razmikih z določevanje bodisi preostalega ^{14}C bodisi sproščenega $^{14}CO_2$ (glejte oddelek 1.8.9.4) in/ali s specifično kemijsko analizo (glejte 1.8.9.5). Trajanje inkubacije mora biti dovolj dolgo, da se ovrednoti postopek razgradnje. Obseg razgradnje mora prednostno preseči 50 %; za počasi razgradljive snovi mora biti obseg razgradnje zadosten (običajno večji od 20 %), da se lahko oceni kinetična konstanta hitrosti razgradnje.

▼M1

V preskusnem sistemu je treba opraviti obdobne meritve pH in koncentracije kisika, razen če so takšne meritve nepotrebne zaradi predhodnih izkušenj iz podobnih preskusov z vodo in sedimenti iz istega mesta vzorčenja. V nekaterih pogojih lahko presnova primarnih substratov v veliko višjih koncentracijah v vodi ali sedimentu povzroči dovolj sproščenega CO_2 in izrabo kisika, da se bistveno spremenijo pogoji poskusa.

1.8.9 **Postopek**

1.8.9.1 *Priprava bučk za pelagični preskus*

Primeren volumen preskusne vode se prenese v preskusne bučke, ki se napolnijo do približno ene tretjine volumna bučke, vendar ne manj kot približno 100 ml. Če se uporabi več bučk (da je omogočen odvzem celotnih bučk za vsako vzorčenje) je primeren volumen preskusne vode tudi približno 100 ml, saj lahko majhni volumni vzorca vplivajo na dolžino faze prilagajanja. Preskusna snov se doda iz založne raztopine, kakor je opisano v oddelkih 1.8.2 in 1.8.7. Uporabiti je treba najmanj dve različni koncentraciji preskusne snovi, ki se razlikujeta za faktor od 5 do 10, da se določi kinetika razgradnje in izračuna kinetična konstanta hitrosti razgradnje. Obe izbrani koncentraciji morata biti nižji od 100 μg/l in prednostno v območju < 1–10 μg/l.

Bučke se zaprejo z zamaški ali zaporkami, ki ne prepuščajo zraka in CO_2. Za nehlapne preskusne kemikalije, ki niso označene s ^{14}C, so primerni razrahljani vatirani čepi, ki preprečujejo onesnaženje iz zraka (glejte oddelek 1.8.1), pod pogojem, da je za poglavitne produkte razgradnje znano, da so nehlapni in da se uporablja posredno določevanje CO_2 (glejte Dodatek 3).

Bučke inkubirajte pri izbrani temperaturi (glejte oddelek 1.8.8.1). Vzorci za kemijsko analizo ali meritve ^{14}C se odvzamejo na začetku preskusa (tj. preden se začne biorazgradnja; glejte oddelek 1.7.1) in v primernih časovnih razmikih med preskusom. Vzorčenje se opravi z odvzemom podvzorcev (npr. 5-ml alikvotov) iz vsake ponovitve ali z odvzemom celotnih bučk pri vsakem času vzorčenja. Mineralizacija preskusne snovi se lahko določi posredno ali neposredno (glejte Dodatek 3). Običajno je med fazo razgradnje (tj. po zaključeni fazi prilagajanja) potrebnih najmanj pet vzorčnih točk, da se zanesljivo oceni konstanta hitrosti, razen če se za hitro razgradljive snovi utemelji, da so dovolj tri vzorčne točke. Za snovi, ki se ne razkrajajo hitro, je med fazo razgradnje enostavno opraviti več meritev in zato je treba v oceno k vključiti več podatkovnih točk. Ni mogoče določiti fiksnega časovnega razporeda vzorčenja, saj hitrost biorazgradnje variira. Vendar pa je priporočljivo vzorčiti enkrat tedensko, če je razgradnja počasna. Če se preskusna snov hitro razkraja, je treba vzorčenje opraviti enkrat dnevno v prvih treh dneh in nato vsak drug ali tretji dan. V določenih pogojih, kot so zelo hitro hidrolizirajoče snovi, je morda treba vzorčiti v urnih razmikih. Priporočljivo je, da se pred preskusom opravi predhodna raziskava, v kateri se določijo ustrezni razmiki vzorčenja. Če je treba vzorce ohraniti za dodatne specifične analize, je priporočljivo, da se odvzame več vzorcev in izberejo tisti, ki jih je treba analizirati na koncu poskusa z vzvratno strategijo, tj. zadnji vzorci se analizirajo prvi (glejte drugi odstavek v oddelku 1.8.9.5 za smernice o obstojnosti vzorcem med shranjevanjem).

▼M1

1.8.9.2 *Število bučk in vzorcev*

Pripraviti je treba dovolj veliko število preskusnih bučk, da so na voljo:

— preskusne bučke; najmanj dvojnik za vsako koncentracijo preskusne snovi (prednostno najmanj 3) ali več preskusnih bučk za vsako koncentracijo, če se ob vsakem vzorčenju odvzamejo cele bučke (označene z F_T),

— preskusne bučke za izračun masne bilance; najmanj dvojnik za vsako preskusno koncentracijo (označeno z F_M),

— slepi kontrolni vzorec brez preskusne snovi; najmanj ena slepa kontrolna preskusna bučka, ki vsebuje le preskusno vodo (označeno z F_B),

— referenčni kontrolni vzorec; dvojnik z referenčno snovjo (npr. anilin ali natrijev benzoat, koncentracija 10 µg/l) (označeno z F_C). Namen referenčnega kontrolnega vzorca je potrditev najmanjše mikrobne aktivnosti. Če je ustrezno, se lahko uporabi radioaktivno označena snov, tudi če se razgradnja preskusne snovi spremlja s kemijskimi analizami,

— sterilni kontrolni vzorec; ena ali dve bučki, ki vsebujeta sterilizirano preskusno vodo, za preučevanje možne abiotske razgradnje ali drugačnega nebiološkega izginevanja preskusne snovi (označeno z F_S). Biološko aktivnost je možno ustaviti z avtoklaviranjem (121 °C; 20 min) preskusne vode ali z dodajanjem strupene snovi (npr. natrijevega azida (NaN_3) v koncentraciji 10–20 g/l, živosrebrnega klorida ($HgCl_2$) v koncentraciji 100 mg/l ali formalina v koncentraciji 100 mg/l) ali s sevanjem gama. Če se uporabi $HgCl_2$, ga je treba odstraniti kot strupen odpadek. Če se vodi doda sediment v veliki količini, sterilnosti ni enostavno doseči. V tem primeru je priporočljivo zaporedno avtoklaviranje (npr. trikrat). Preučiti je treba, ali avtoklaviranje morda spremeni sorpcijske lastnosti sedimenta,

— kontrolni vzorci s topilom, vsebujejo preskusno vodo in preskusno vodo z referenčno snovjo; dvojniki bučk, obdelani z enako količino topila in enakim postopkom, kakor se uporablja za vnos preskusne snovi. Namen je preveriti možne neželene učinke topila z določitvijo razgradnje referenčne snovi.

V zasnovi preskusa mora raziskovalec preučiti relativni pomen povečanja števila ponovitev proti povečanju števila vzorčenj. Natančno število potrebnih bučk bo odvisno od metode za merjenje razgradnje (glejte tretji odstavek v oddelku 1.8.9.1; oddelek 1.8.9.4 in Dodatek 3).

▼M1

V vsakem vzorčenju je treba iz vsake preskusne bučke odvzeti dva podvzorca (npr. 5-ml alikvota). Če se uporablja več bučk, da je omogočen odvzem celotnih bučk, je treba pri vsakem vzorčenju žrtvovati najmanj dve bučki (glejte prvi odstavek v oddelku 1.8.9.1).

1.8.9.3 *Priprava bučk za preskus s suspendiranim sedimentom [neobvezen]*

V preskusne posode se doda potrebni volumen preskusne vode in sedimenta, če je treba (glejte oddelek 1.8.5). Priprava bučk za preskus suspendiranega sedimenta je enaka kot za pelagični preskus (glejte oddelka 1.8.9.1. in 1.8.9.2). Prednostno je treba uporabljati serumske steklenice ali podobno oblikovane bučke. Zaprte bučke se položijo na stresalnik. Seveda je treba odprte bučke za nehlapne snovi, ki niso označene s ^{14}C, postaviti pokonci. V tem primeru je priporočljiva uporaba magnetnega mešanja in magnetnih palčk, ki so prevlečene s steklom. Po potrebi se steklenice aerirajo, da se ohranjajo ustrezni aerobni pogoji.

1.8.9.4 *Radiokemijske določitve*

Sproščeni $^{14}CO_2$ se meri posredno ali neposredno (glejte Dodatek 3). $^{14}CO_2$ se določa posredno z razliko med začetno aktivnostjo ^{14}C v preskusni vodi ali suspenziji in skupno preostalo aktivnostjo v času vzorčenja, ki se izmeri po zakisanju vzorca na pH 2–3 in odstranitvi CO_2. S tem se odstrani anorganski ogljik in izmerjena preostala aktivnost izvira iz organskega materiala. Če se med transformacijo preskusne snovi tvorijo poglavitni hlapni produkti transformacije, se posredno določevanje $^{14}CO_2$ ne sme uporabiti (glejte Dodatek 3). Če je možno, je treba sproščanje $^{14}CO_2$ meriti neposredno (glejte Dodatek 3) v vsakem času vzorčenja in v najmanj eni preskusni bučki. Ta postopek omogoča preverjanje tako masne bilance in postopka biorazgradnje, vendar je omejen na preskuse, ki se opravljajo v zaprtih bučkah.

Če se sproščeni $^{14}CO_2$ med preskusom meri neposredno, je treba v ta namen na začetku preskusa pripraviti več bučk. Če se med transformacijo preskusne snovi tvorijo poglavitni hlapni produkti transformacije, je priporočljivo neposredno določevanje $^{14}CO_2$. V vsaki točki merjenja se dodatne preskusne bučke zakisajo na pH 2–3, nato pa se $^{14}CO_2$ zbere v notranji ali zunanji absorpcijski posodi (glejte Dodatek 3).

Neobvezno se lahko koncentracije s ^{14}C označene preskusne snovi in poglavitnih produktov transformacije določijo z radiokromatografijo (npr. tankoplastno kromatografijo, RAD-TLC) ali HPLC z radiokemijskim zaznavanjem.

Neobvezno se lahko določi fazna porazdelitev preostale radioaktivnosti (glejte Dodatek 1) ter preostala preskusna snov in produkti transformacije.

▼M1

Na koncu preskusa je treba določiti masno bilanco z neposrednim merjenjem $^{14}CO_2$ v ločeni poskusni bučki, iz katere med poskusom ni bil odvzet noben vzorec (glejte Dodatek 3).

1.8.9.5 *Specifična kemijska analiza*

Če je na voljo specifična analitska metoda, se lahko primarna biorazgradnja določi z merjenjem preostale koncentracije preskusne snovi namesto uporabe tehnik radioaktivnega označevanja. Če se uporabi radioaktivno označena preskusna snov (za merjenje skupne mineralizacije), se lahko vzporedno opravijo specifične kemijske analize, ki dajo uporabne dodatne podatke in s katerimi se preverja postopek. Specifične kemijske analize se lahko tudi uporabijo za merjenje produktov transformacije, ki nastanejo med razgradnjo preskusne snovi. Ta pristop je priporočljiv za snovi, ki se mineralizirajo z razpolovno dobo, daljšo od 60 dni. Koncentracijo preskusne snovi in produktov transformacije je treba pri vsaki ponovitvi vzorčenja izmeriti in o njej poročati (o koncentraciji in o uporabljenem odstotku). Na splošno je treba ugotoviti produkte transformacije, ki se pri katerem koli vzorčenju zaznajo pri ≥ 10 % uporabljene koncentracije, razen če ni upravičeno utemeljeno drugače. Tudi produkte transformacije, pri katerih se koncentracije med raziskavo nenehno povečujejo, je treba upoštevati pri ugotavljanju, tudi če njihove koncentracije ne presegajo zgornje omejitve, ker lahko označujejo obstojnost. Če je možno, da se preskusna snov hitro abiotsko pretvarja (npr. s hidrolizo), je treba preučiti izvedbo analiz produktov transformacije v sterilnih kontrolnih vzorcih. Potrebo po količinski opredelitvi in določevanju produktov transformacije je treba upoštevati glede na vsak primer posebej in v poročilu podati utemeljitev. Tehnike ekstrakcije z organskim topilom je treba uporabiti po navodilih v ustreznem analitičnem postopku.

Če se analiza opravi v 24 urah (prednostno), je treba vse vzorce shranjevati pri 2 do 4 °C in zrakotesno. Če je shranjevanje daljše, je treba vzorce zamrzniti pod – 18 °C ali kemijsko konzervirati. Zakisanje ni priporočljiva metoda konzerviranja vzorcev saj so lahko zakisani vzorci neobstojni. Če se vzorci ne analizirajo v 24 urah in so shranjevani dlje, je treba opraviti raziskavo obstojnosti med shranjevanjem, da se dokaže obstojnost želenih kemikalij med shranjevanjem pri – 18 °C ali v pogojih konzerviranja. Če analitična metoda vključuje bodisi ekstrakcijo s topili ali ekstrakcijo trdne faze (SPE), je treba ekstrakcijo opraviti nemudoma po vzorčenju ali po ohlajenem shranjevanju za največ 24 ur.

Morda bodo potrebni volumni vzorcev, večji od prikazanih v oddelku 1.8.1, odvisno od občutljivosti analitične metode. Preskus se enostavno izvede s preskusnim volumnom 1 liter v bučkah s prostornino 2–3 litra, ko je možno jemati vzorce približno 100 ml.

▼M1

2. **PODATKI IN POROČANJE**

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

2.1.1 **Prikaz podatkov**

Čase vzorčenja je treba zaokrožiti na celo število ur (razen, če se snov bistveno razkraja v minutah do urah), ne pa na celo število dni. Prikazati je treba ocene preostale aktivnosti preskusne snovi (za snovi označene s ^{14}C) ali preostale koncentracije (za neoznačene snovi) v odvisnosti od časa v linearnem in pollogaritemskem prikazu (glejte sliki 1a in 1b). Če je prišlo do razgradnje, se primerjajo rezultati iz bučk F_T in bučk F_S. Če se povprečne vrednosti rezultatov iz bučk s preskusno snovjo (F_T) in sterilnih bučk (F_S) razlikujejo za manj kot 10 %, se lahko predpostavi, da je opažena razgradnja pretežno abiotska. Če je razgradnja v bučkah F_S manjša, se lahko s temi številkami popravi številke bučk F_T (z odštevanjem), da se oceni obseg biorazgradnje. Kadar se opravljajo neobvezne analize za poglavitne produkte transformacije, je treba prikazati njihovo nastajanje ali upad poleg prikaza upada preskusne snovi.

V krivulji razgradnje (pollogaritemski prikaz) se z ekstrapolacijo krivulje do odsotnosti razgradnje oceni dolžina faze prilagajanja. Namesto tega se lahko dolžina faze prilagajanja oceni z določitvijo časa, potrebnega za približno 10 % razgradnje (glejte sliki 1a in 1b). Iz pollogaritemskega prikaza se z linearno regresijo odvisnosti ln (preostale aktivnosti ^{14}C ali koncentracije preskusne snovi) od časa oceni konstanto hitrosti prvega reda, k, in njeno standardno napako. Zlasti pri meritvah ^{14}C se uporabijo le podatki iz začetnega linearnega dela krivulje po zaključku faze prilagajanja, pri čemer se prednostno izbere nekaj reprezentativnih podatkov pred izborov večjega števila bolj negotovih podatkov. Tu negotovost vključuje napake, ki so vezane na priporočljivo neposredno uporabo izmerjenih preostalih aktivnosti ^{14}C (glejte spodaj). V določenih primerih je pomembno izračunati dve različni konstanti hitrosti, če razgradnja sledi bifaznemu vzorcu. Za ta namen se določijo dve različni fazi krivulje razgradnje. Konstanto hitrosti, k, in razpolovno dobo $t_1 = \ln 2/k$ je treba izračunati za vsako posamezno vzporedno bučko, če se iz iste bučke jemlje več podvzorcev, ali s pomočjo povprečnih vrednosti, če se ob vzorčenju jemljejo celotne bučke (glejte zadnji odstavek oddelka 1.8.9.2). Če se uporabi prvi omenjeni postopek, je treba konstanto hitrosti razgradnje in razpolovno dobo navesti za vsako posamezno vzporedno bučko in kot povprečno vrednost s standardno napako. Če se uporabijo visoke koncentracije preskusne snovi, lahko krivulja razgradnje znatno odstopa od premice (pollogaritemski prikaz) in kinetika prvega reda morda ne velja. Določitev razpolovne dobe zato nima smisla. Vendar je mogoče za omejen niz podatkov uporabiti psevdo kinetiko prvega reda in oceni razpolovno dobo DT_{50} (čas za 50 % razgradnje). Vendar je treba upoštevati, da časovnega poteka razgradnje po izbranem nizu podatkov ni mogoče napovedati z DT_{50}, ki opisuje le dani nabor podatkov. Analitična orodja za statistične izračune in prilagajanje krivulj so enostavno dostopna in uporaba tovrstne programske opreme je priporočljiva.

▼M1

Če se opravljajo specifične kemijske analize, se ocenijo konstante hitrosti in razpolovne dobe za primarno razgradnjo, kakor je opisano zgoraj za skupno mineralizacijo. Če je primarna razgradnja omejen proces, se lahko v nekaterih primerih uporabijo podatkovne točke iz celotnega poteka razgradnje. To je zato, ker so meritve neposredne, nasprotno kot pri meritvah aktivnosti ^{14}C.

Če so se uporabile s ^{14}C označene snovi, je treba masno ravnovesje izraziti v odstotkih vnesene začetne koncentracije, najmanj na koncu preskusa.

2.1.2 **Preostala aktivnost**

Ko se biorazkraja s ^{14}C označen del organske snovi, se večji del ^{14}C pretvori v $^{14}CO_2$, drugi del pa se uporabi za rast biomase in/ali sintezo izvenceličnih presnovkov. Zato dokončna „popolna“ biorazgradnja snovi ne pomeni 100-odstotne pretvorbe ogljika iz te snovi v $^{14}CO_2$. ^{14}C, ki se vgradi v produkte, nastale v biosintezi, se naknadno počasi sprosti kot $^{14}CO_2$ zaradi „sekundarne mineralizacije“. Zaradi tega prikazi preostale aktivnosti organskega ^{14}C (izmerjeni po odstranitvi CO_2) ali nastalega $^{14}CO_2$ v odvisnosti od časa kažejo „rep“ po zaključku razgradnje. To zaplete kinetično interpretacijo podatkov in za ta namen je treba za oceno konstante hitrosti razgradnje običajno uporabiti le začetni del krivulje (po zaključku faze prilagajanje in pred 50-odstotno razgradnjo). Če se preskusna snov razkraja, je skupna preostala aktivnost organskega ^{14}C vedno večja od aktivnosti ^{14}C, povezane s preostalo nerazgrajeno preskusno snovjo. Če poteka razgradnja preskusne snovi z reakcijo prvega reda in se v CO_2 mineralizira konstantni delež α, je začetni naklon krivulje izginevanja ^{14}C (skupni organski ^{14}C v odvisnosti od časa) α-krat naklon ustrezne krivulje koncentracije preskusne snovi (oz. natančno rečeno, dela preskusne snovi, ki je označen s ^{14}C). Konstanta hitrosti razgradnje, izračunana iz nepopravljenih meritev aktivnosti skupnega organskega ^{14}C, bo zato konzervativna. Postopki za ocenjevanje koncentracij preskusne snovi iz izmerjenih radiokemijskih aktivnosti, ki temeljijo na raznih poenostavitvenih predpostavkah, so opisani v virih (2)(9)(10)(11). Takšne postopke je najenostavneje uporabiti za hitro razgradljive snovi.

2.2 RAZLAGA REZULTATOV

Če se ugotovi, da je k neodvisen od dodane koncentracije (tj. če je izračunani k približno enak pri različnih koncentracijah preskusne snovi), se lahko predpostavi, da je konstanta hitrosti prvega reda reprezentativna za uporabljene pogoje preskušanja, tj. preskusno snov, vzorec vode in preskusno koncentracijo. Do kakšne mere se lahko rezultati generalizirajo ali ekstrapolirajo na druge sisteme, pa je treba ovrednotiti s strokovno presojo. Če se uporabijo visoke koncentracije preskusne snovi in razgradnja zato ne sledi kinetiki prvega reda, podatkov ni mogoče uporabiti za neposredno oceno konstante hitrosti prvega reda ali ustrezne razpolovne dobe. Vendar so podatki, pridobljeni iz preskusa z visokimi koncentracijami preskusne snovi, lahko še vedno uporabni za ocenjevanje stopnje skupne mineralizacije in/ali zaznavanje in količinsko produktov transformacije.

▼M1

Če so znane hitrosti drugih postopkov izginevanja poleg biorazgradnje (npr. hidrolize ali izhlapevanja), se lahko odštejejo od neto hitrosti izginevanja med preskusom, da se dobi približna ocena hitrosti biorazgradnje. Podatki za hidrolizo se lahko npr. pridobijo iz sterilnega kontrolnega vzorca ali iz vzporednega preskušanja z višjo koncentracijo preskusne snovi.

Posredno in neposredno določevanje $^{14}CO_2$ (oddelek 1.8.9.4 in Dodatek 3) se lahko uporabita le za merjenje obsega mineralizacije preskusne snovi v CO_2. Za analizo koncentracij s ^{14}C označene preskusne snovi in tvorbe poglavitnih produktov transformacije (tretji odstavek oddelka 1.8.9.4) se lahko uporabita radiokromatografija (RAD-TLC) ali HPLC. Da se omogoči neposredno ocenjevanje razpolovne dobe, je nujno, da ni prisotnih drugih poglavitnih produktov transformacije (opredeljeno kot ≥ 10 % vnesene količine preskusne snovi). Če so prisotni poglavitni produkti transformacije, kakor so opredeljeni tu, je potrebno podrobno vrednotenje podatkov. To lahko vključuje ponovitve preskušanja in/ali določitev produktov transformacije (glejte prvi odstavek oddelka 1.8.9.5), razen če lahko usodo produktov transformacije upravičeno ovrednotimo na podlagi izkušenj (npr. podatki o poteh razgradnje). Ker se delež preskusne snovi, ki se pretvori v CO_2, razlikuje (odvisno v večji meri od koncentracije preskusne snovi in drugih dostopnih substratov, preskusnih pogojev in mikrobne skupnosti), ta preskus ne omogoča enostavne ocene popolne biorazgradnje kakor v preskusu upadanja DOC, vendar je rezultat podoben kakor pri respirometričnem preskusu. Stopnja mineralizacije bo tako manjša ali enaka najnižji ravni popolne biorazgradnje. Da se določi popolnejša slika popolne biorazgradnje (mineralizacija in vgradnja v biomaso), je treba na koncu preskusa opraviti analizo fazne porazdelitve ^{14}C (glejte Dodatek 1). ^{14}C v delcih bo sestavljen iz ^{14}C, ki je vgrajen v bakterijsko biomaso, in ^{14}C, ki je sorbiran na organske delce.

2.3 VELJAVNOST PRESKUSA

Če se referenčna snov ne razgradi v pričakovanem časovnem obdobju (za anilin in natrijev benzoat običajno prej kot v dveh tednih), obstaja dvom o veljavnosti preskusa, zato je treba veljavnost dodatno preveriti ali pa se preskus ponovi z novim vzorcem vode. V ISO preskusu primerljivosti metode je sedem laboratorijev, izbranih iz cele Evrope, ugotovilo konstante hitrosti razgradnje za anilin, ki so variirale od 0,3 do 1,7 dan^{-1} s povprečno vrednostjo 0,8 d^{-1} pri 20 °C in standardno napako ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dni). Tipični časi prilagoditve so bili od 1 do 7 dni. Preiskane vode so imele po navedbah bakterijsko maso, ki je ustrezala 10^3–10^4 kolonije tvorečim delcem (CFU) na ml. Hitrosti razgradnje v srednjeevropskih vodah, bogatih s hranili, so bile višje od hitrosti v nordijskih oligotrofnih vodah. Razlike so lahko nastale zaradi različnega trofičnega statusa ali zaradi predhodne izpostavitve kemijskim snovem.

Skupni izkoristek (masna bilanca) na koncu poskusa bi morala biti med 90 % in 110 % za radioaktivno označene snovi, začetni izkoristek na začetku poskusa bi moral biti med 70 % in 110 % za neoznačene snovi. Vendar se morajo nakazana območja šteti le za ciljna in se ne smejo uporabiti kot kriteriji za sprejemljivost preskusa.

▼M1

3. **POROČILO O PRESKUSU**

Na poročilu o preskusu je treba jasno navesti vrsto raziskave, tj. pelagični preskus ali preskus suspendiranega sedimenta. Poročilo o preskusu mora vsebovati tudi najmanj naslednje podatke:

Preskusna snov in referenčna snov/referenčne snovi:

— splošna imena, kemijska imena (priporočeno poimenovanje po IUPAC in/ali CAS), številke po CAS, strukturne formule (z navedbo položaja ^{14}C, če se uporabi radioaktivno označena snov) in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti preskusne in referenčne snovi (glej oddelka 1.5 in 1.6),

— kemijska imena, številke po CAS, strukturne formule (z navedbo položaja ^{14}C, če se uporabi radioaktivno označena snov) in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti snovi, ki se uporabijo kot standardi za določitev in količinsko opredelitev produktov transformacije,

— čistoto (nečistote) preskusne snovi in referenčnih snovi,

— radiokemijsko čistoto označene kemikalije in specifično aktivnost (kadar je primerno).

Površinska voda:

Navesti je treba najmanj naslednje podatke o odvzetem vzorcu vode:

— lokacijo in opis mesta vzorčenja, vključno, če je mogoče, s preteklim onesnaženjem,

— datum in uro vzorčenja,

— hranila (skupni N, amoniak, nitrit, nitrat, skupni P, raztopljeni ortofosfat),

— globina odvzema,

— izgled vzorca (npr. barva in motnost),

— vrednosti DOC in TOC,

— vrednost BOD,

— temperaturo in pH na mestu vzorčenja v času vzorčenja,

— kisikov in redoks potencial (obvezno, če aerobni pogoji niso očitni),

— slanost ali prevodnost (v primeru morske vode in brakične vode),

— suspendirane trdne snovi (v primeru motnega vzorca),

— po možnosti druge pomembne podatke o mestu vzorčenja v času vzorčenja (npr. dejanski ali zgodovinski podatki o pretoku rek ali morskih tokov, bližnji poglavitni iztoki in vrsta iztokov, vremenski pogoji pred časom vzorčenja),

in neobvezno:

— mikrobno biomaso (npr. neposredno štetje z akridinskim oranžnim ali določitev delcev, ki tvorijo kolonije),

▼M1

— anorganski ogljik,

— koncentracijo klorofila kot specifično oceno biomase alg.

Poleg opisanega je treba navesti naslednje podatke o sedimentu, če se opravlja preskus suspendiranega sedimenta:

— globina odvzema sedimenta,

— izgled sedimenta (npr. obarvan, blaten, muljast ali peščen),

— tekstura (npr. delež grobega peska, drobnega peska, mulja in gline),

— suha masa v g/l suspendiranih trdnih snovi, koncentracija TOC ali zmanjšanje mase po sežigu kot merilo vsebnosti organske snovi,

— pH,

— kisikov in redoks potencial (obvezno, če aerobni pogoji niso očitni).

Preskusni pogoji:

— zakasnitev med odvzemom in uporabo v laboratorijskem preskus, shranjevanje vzorca in predobdelava vzorca, datum izvedbe raziskav,

— količina uporabljene preskusne snovi, preskusne koncentracije in referenčne snovi,

— metoda vnosa preskusne snov, vključno z uporabo topil,

— uporabljeni volumen površinske vode in sedimenta (če se je uporabil) in volumen vzorcev, odvzetih za analizo v vsakem časovnem obdobju,

— opis uporabljenega preskusnega sistema.

Če se ne uporabi tema, podatki o pogojih „difuzne svetlobe“;

— podatke o metodi/metodah uporabljenih za vzpostavitev sterilnih kontrol (npr. temperatura, trajanje in število ciklov avtoklaviranja),

— inkubacijsko temperaturo,

— podatke o analitskih tehnika in metodi/metodah, uporabljenih za radiokemijske meritve in za preverjanje masne bilance ter meritve fazne porazdelitve (če so bile opravljene),

— število ponovitev.

Rezultati:

— odsotki izkoristka (glejte oddelek 1.7.1),

— ponovljivost in občutljivost uporabljenih analitskih metod, vključno z mejo zaznavnosti (LOD) in mejo količinske opredelitve (LOQ) (glejte oddelek 1.7.2),

▼M1

— vse izmerjene podatke (vključno s časom vzorčenja) in izračunane vrednosti v preglednici ter krivulje razgradnje; za vsako preskusno koncentracijo in za vsako vzporedno bučko je treba navesti koeficient linearne korelacije za naklon logaritemske krivulje, ocenjeno fazo prilagajanja in konstanto hitrosti prvega reda ali psevdo prvega reda (če je možno) ter ustrezno razpolovno dobo razgradnje (ali trajanje razpolovne dobe t_{50}),

— navesti pomembne vrednosti, kot so povprečja rezultatov, opaženih v posameznih ponovitvah, npr. dolžina faze prilagajanja, konstanto hitrosti razgradnje in razpolovno dobo razgradnje (ali t_{50}),

— uvrstiti sistem kot neprilagojen ali prilagojen na osnovi izgleda krivulje razgradnje in iz možnih vplivov na preskusno koncentracijo,

— rezultate končnega preverjanja masne bilance in rezultate meritev fazne porazdelitve (če so bile opravljene),

— delež mineraliziranega ^{14}C in končna raven primarne razgradnje, če se uporabijo specifične analize,

— določitev, molska koncentracija in odstotek vnesenih in poglavitnih produktov transformacije (glejte prvi odstavek oddelka 1.8.9.5), kadar je primerno,

— predlagane poti transformacije, kadar je primerno,

— razpravo o rezultatih.

4. **VIRI**

(1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

(2) ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

(3) Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

(4) Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

(5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

(6) ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

(7) ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(8) OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

(9) Simkins, S. in Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394–401.

(10) Ingerslev, F. in N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

(11) ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Dodatek 1

Fazna porazdelitev ^{14}C

Zaradi preverjanja postopka je treba rutinske meritve preostale skupne aktivnosti organskega ^{14}C (TOA) dopolniti z meritvami masne bilance, ki vključujejo neposredno določevanje sproščenega $^{14}CO_2$ po zajetju v absorpcijsko posodo (glejte Dodatek 3). Pozitiven rezultat tvorbe $^{14}CO_2$ je sam po sebi neposreden dokaz biorazgradnje in je v nasprotju z abiotsko razgradnjo ali drugačnim izginevanjem, npr. izhlapevanjem in sorpcijo. Dodatne uporabne podatke, ki opisujejo obnašanje biorazgradnje, je možno dobiti iz meritev porazdelitve TOA med raztopljenim stanjem (raztopljena aktivnost organskega ^{14}C, DOA) in delci (aktivnost organskega ^{14}C v delcih, POA) po ločevanju delcev z membransko filtracijo ali centrifugiranjem. POA obsega preskusno snov, ki je sorbirana na mikrobno biomaso in na druge delce, ter ogljik preskusne snovi, ki je bil uporabljen za sintezo novega celičnega materiala in s tem vgrajen v frakcijo biomase, ki jo predstavljajo delci. Kot oceno nastajanja raztopljenega organskega materiala s ^{14}C lahko uporabimo DOA na koncu biorazgradnje (izravnanje krivulje odvisnosti razgradnje od časa).

Fazna porazdelitev preostalega ^{14}C v izbranih vzorcih se oceni s filtracijo vzorcev skozi 0,22-µm ali 0,45-µm membranski filter iz materiala, ki ne adsorbira znatnih količin preskusne snovi (primerni so lahko polikarbonatni filtri). Če je sorpcija preskusne snovi na filter preobsežna, da bi jo lahko zanemarili (kar je treba preverite pred poskusom), se lahko namesto filtracije uporabi centrifugiranje (2 000 g; 10 min).

S filtratom oziroma centrifugatom ravnajte, kakor je opisano v Dodatku 3 za nefiltrirane vzorce. Membranske filtre je treba raztopiti v primerni scintilacijski tekočini in prešteti, kakor ponavadi. Običajno se uporabi le metoda razmerja zunanjega standarda za korekcijo pojenjanja ali oksidant za vzorec. Če se je uporabilo centrifugiranje, se sediment resuspendira, da nastane frakcija z delci v 1–2 ml destilirane vode, ki se jo prenese v scintilacijsko vialo. Centrifugirano posodo dvakrat speremo z 1 ml destilirane vode in izpirek prenesemo v scintilacijsko vialo. Če je treba, se lahko suspenzijo vklopi v gel za tekočinsko scintilacijsko štetje.

▼M1

Dodatek 2

Polkontinuiran postopek

Da se doseže zadostna razgradnja odpornih snovi je lahko potrebna podaljšana inkubacija do več mesecev. Trajanje preskusa običajno ne sme preseči 60 dni, razen če se lastnosti prvotnega vzorca vode ohranjajo z obnavljanjem preskusne suspenzije. Vendar je možno preskusno obdobje podaljšati do največ 90 dni brez obnavljanja preskusne suspenzije, če se razgradnja preskusne snovi po prvih 60 dneh še ni začela.

Med inkubacijo za dolga obdobja se lahko raznolikost mikrobne združbe zmanjša zaradi različnih mehanizmov izginjanja in zaradi možnega osiromašenja vzorca vode esencialnih hranil in primarnih substratov ogljika. Zato je priporočljivo, da se uporabi polkontinuiran preskus, s katerim se zadostno določi hitrost razgradnje počasi razgradljivih snovi. Preskus je treba začeti s polkontinuiranim postopkom, če se za 20-odstotno razgradnjo snovi lahko na podlagi predhodnih izkušenj pričakuje trajanje inkubacije tri mesece. V nasprotnem primeru se lahko običajni serijski preskus spremeni v polkontinuiran preskus, če v približno 60 dneh preskušanja v serijskem preskusu ni dosežena nikakršna razgradnja preskusne snovi. Če se opazi znatna razgradnja (npr. > 20 %) se lahko polkontinuiran postopek ustavi in preskus nadaljuje kot serijski poskus.

V polkontinuiranem preskusu se vsake dva tedna približno ena tretjina volumna preskusne suspenzije zamenja s sveže odvzeto vodo, kateri je dodana preskusna snov v začetni koncentraciji. Nadomestni vodi podobno dodamo sediment v začetni koncentraciji (med 0,01 in 1 g/l), če se opravlja preskus suspendiranega sedimenta. Če se opravlja preskus suspendirane trdne snovi iz sedimenta, je pomembno, da popolnoma suspendiran sistem ohranjamo tudi med obnavljanjem vode in da je zadrževalni čas identičen za trdne snovi in vodo, saj lahko v nasprotnem primeru izgubimo nameravano podobnost s homogenim vodnim sistemom brez fiksiranih faz. Iz teh razlogov ima pri uporabi polkontinuiranega postopka prednost začetna koncentracija suspendiranih sedimentov na spodnji meji navedenega intervala.

Predpisano dodajanje preskusne snovi kaže, da se začetne koncentracije preskusne snovi pri delnem obnavljanju preskusne suspenzije ne presežejo, zato ne pride do prilagajanja, ki se sicer pogosto pojavi pri visokih koncentracijah. Ker postopek obsega tako ponovno inokulacijo in nadomestilo osiromašenih hranil in primarnih substratov, se izvirna mikrobna raznolikost obnovi in trajanja preskusa se lahko podaljša v principu do neskončnosti. Kadar se uporabi polkontinuiran postopek, je pomembno upoštevati, da se preostala koncentracija preskusne snovi popravi za količino preskusne snovi, ki se doda in odvzame pri vsakem postopku obnove. Pri spojinah, ki se sorbirajo v majhnem obsegu, se lahko pojma skupna in raztopljena koncentracija preskusne snovi uporabljata enakovredno. V navedenih pogojih (0,1–1 g trdnih snovi/l) je sorpcija nepomembna (< 5 %) za snovi z log Kow < 3 (velja za nevtralne, lipofilne spojine). To ponazarja naslednji primer izračuna. 0,1 g/l trdnih snovi grobo ustreza 10 mg ogljika na liter (delež ogljika, f_C = 0,01). Ob predpostavki, da:

Log K_{ow} (preskusne snovi) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Porazdelitveni koeficient, $K_d = f_C \times K_{oc}$

velja, da raztopljena frakcija skupne koncentracije (C-voda (C_w)/C-skupno (C_t) je:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatek 3

Določitev $^{14}CO_2$

Posredna določitev $^{14}CO_2$

Za rutinske meritve je posredna metoda ponavadi najhitrejša in najbolj natančna, če je preskusna metoda nehlapna in se ne pretvarja v hlapne produkte transformacije. Nefiltrirane vzorce, npr. 5 ml, se preprosto prenese v scintilacijske viale. Primerna začetna aktivnost v vzorcih je 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq), najmanjša začetna aktivnost pa je približno 1 000 dpm. Po zakisanju na pH 2–3 z 1–2 kapljicama koncentrirane H_3PO_4 ali HCl je treba CO_2 odstraniti. Odstranjevanje CO_2 se lahko opravi z uvajanjem zraka za približno ½–1 ure. Namesto tega se lahko viale močno stresa za 1–2 uri (npr. za stresalniku za mikroplošče) ali pusti preko noči pri nežnejšem stresanju. Učinkovitost odstranjevanja CO_2 je treba preveriti (s podaljševanjem trajanja aeracije ali stresanja). Nato se doda scintilacijska tekočina, ki je primerna za štetje vodnih vzorcev. Vzorec se homogenizira na vrtinčastem mešalu, nato pa se s tekočinskim scintilacijskim štetjem določi radioaktivnost, pri čemer se odšteje aktivnost ozadja, določena v slepih vzorcih (F_B). Če preskusna voda ni zelo obarvana in ne vsebuje visoko koncentracijo delcev, bodo vzorci običajno kazali enakomerno pojenjanje, kar bo dovolj za izvedbo korekcije pojenjanja z zunanjim standardom. Če je preskusna voda zelo obarvana, bo potrebna korekcija pojenjanja z dodatkom notranjega standarda. Če je koncentracija delcev visoka, morda ne bo možno doseči homogene raztopine ali gela ali pa bo variacija pojenjanja med vzorci velika. V tem primeru se lahko uporabi metoda štetja, ki je opisana spodaj za preskusne suspenzije. Če se preskus opravlja kot preskus suspendiranega sedimenta, se lahko meritve $^{14}CO_2$ opravijo posredno z odvzemom 10 ml homogenega vzorca preskusne vode/suspenzije in ločitvijo faz s centrifugiranjem pri primerni hitrosti (npr. pri 40 000 m/s^2 za 15 min). Vodno fazo se nato obdela, kakor je opisano zgoraj. Aktivnost ^{14}C v fazi z delci (POA) je treba določiti z resuspendiranjem sedimenta v majhnem volumnu destilirane vode, prenosom v scintilacijske viale in dodatkom scintilacijske tekočine, da nastane gel (za ta namen so na voljo posebne scintilacijske tekočine). Odvisno od narave delcev (npr. njihove vsebnosti organskega ogljika) je morda možno pred dodatkom scintilacijske tekočine vzorec razkrojiti preko noči v topilniku tkiv in ga nato homogenizirati na vrtinčastem mešalu. Namesto tega se lahko POA določi s sežigom v prebitku kisika v oksidantu vzorca. Pri štetju je treba vedno vključiti notranje standarde. Morda bo treba opraviti korekcijo pojenjanja z dodatkom notranjega standarda v vsak posamezni vzorec.

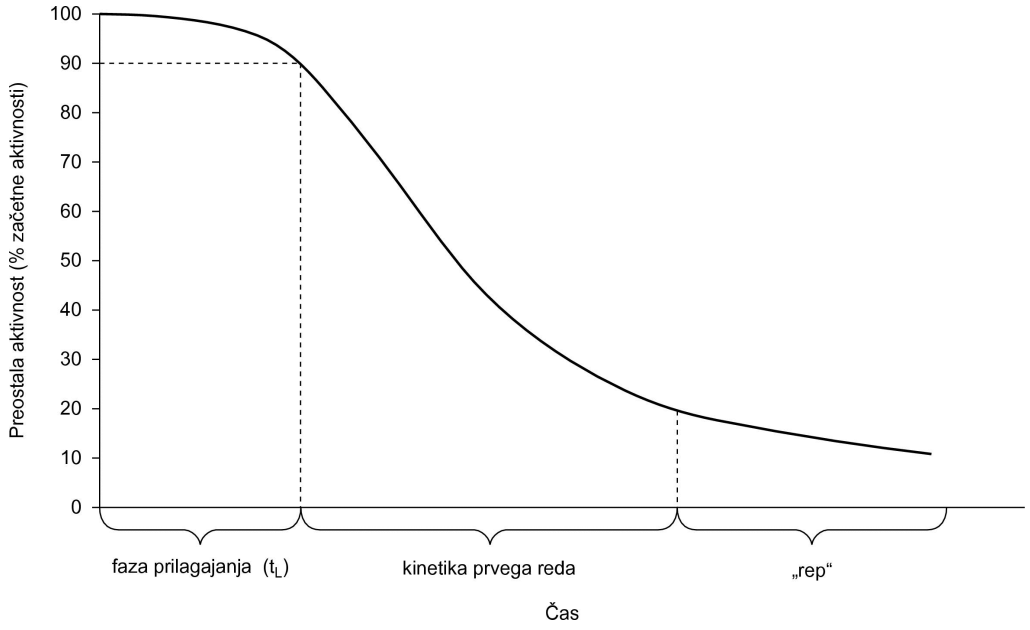
Neposredna določitev $^{14}CO_2$

Če se sproščeni $^{14}CO_2$ meri neposredno, je treba na začetku poskusa začeti z več bučkami, odvzemom preskusnih bučk v vsaki merilni časovni točki z zakisanjem vsebine na pH 2–3 in zajemom $^{14}CO_2$ v notranji (vstavljenem v vsako preskusno bučko na začetku preskusa) ali zunanji absorpcijski posodi. Kot absorpcijsko sredstvo se lahko uporabi bodisi alkalijska snov (npr. 1-normalna raztopina NaOH ali zrno NaOH) bodisi etanolamin ali absorbent na osnovi etanolamina bodisi komercialno dostopni absorbent. Pri neposrednem merjenju $^{14}CO_2$ je treba bučke zapreti z npr. septumom iz butilnega kavčuka.

▼**M1**

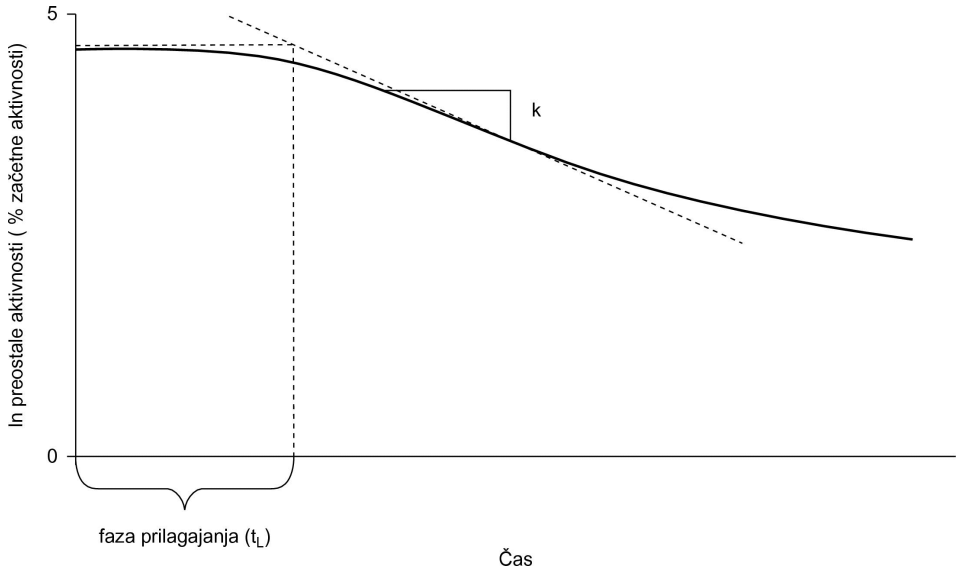
Slika 1a

Primer aritmetičnega prikaza podatkov (preostala aktivnost v odvisnosti od časa)



Slika 1b

Primer pologaritemskega prikaza podatkov (ln preostale aktivnosti v odvisnosti od časa).



▼M6

C.26 PRESKUS ZAVIRANJA RASTI VRSTE *LEMNA*

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 221 (2006). Zasnovana je za določanje strupenosti kemikalij za sladkovodne rastline iz rodu *Lemna* (vodoleČevke). Temelji na obstoječih metodah (1)(2)(3)(4)(5)(6), vendar zaradi upoštevanja nedavnih raziskav in posvetovanj o številnih ključnih vprašanjih vključuje spremembe navedenih metod. Ta preskusna metoda je bila validirana v mednarodnem krožnem preskusu (7).

2. Ta preskusna metoda opisuje preskušanje strupenosti z organizmoma *Lemna gibba* in *Lemna minor*. Oba organizma sta bila obsežno proučena in sta predmet zgoraj navedenih standardov. Taksonomija vrst *Lemna* je težavna zaradi prisotnosti velike množice fenotipov. Čeprav lahko pride do genetske variabilnosti kot odziv na strupene snovi, trenutno ni dovolj podatkov o tej vrsti variabilnosti, na podlagi katerih bi bilo za to preskusno metodo mogoče priporočiti uporabo specifičnega klona. Opozoriti je treba, da se preskus ne opravlja aksenično, temveč se med preskusom uporabljajo ukrepi za čim manjšo kontaminacijo z drugimi organizmi.

3. Podrobno je opisano preskušanje z obnavljanjem preskusne raztopine (polstatično ali pretočno) ali brez obnavljanja le-te (statično). Glede na cilje preskusa in zakonske zahteve je priporočljivo proučiti možnosti uporabe polstatičnih ali pretočnih metod, npr. za kemikalije, ki hitro izginjajo iz raztopine zaradi izhlapevanja, svetlobne razgradnje, obarjanja ali biorazgradnje. Več smernic je na voljo v (8).

4. Uporabljene opredelitve so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

5. Kulturam rastlin iz rodu *Lemna* v eksponentni fazi rasti se omogoči, da sedem dni rastejo kot monokulture v prisotnosti različnih koncentracij preskusne snovi. Cilj preskusa je količinsko opredeliti učinke kemikalije na vegetativno rast v tem obdobju na osnovi izbranih merjenih spremenljivk. Primarna merjena spremenljivka je število listov. Poleg nje se meri vsaj še ena merjena spremenljivka (skupna površina listov, suha ali sveža teža), saj lahko nekatere kemikalije bolj vplivajo na druge merjene spremenljivke kot na število listov. Učinki, ki so odvisni od kemikalije, se količinsko opredelijo tako, da se rast v preskusni raztopini primerja z rastjo kontrol, nato pa se določi koncentracija, ki je povzročila navedeno x-odstotno zaviranje rasti (npr. 50-odstotno). Ta koncentracija se izrazi kot EC_x (npr. EC_{50}).

6. Končna točka preskusa je zaviranje rasti, ki je izraženo kot logaritemsko povečanje merjene spremenljivke (povprečne specifične hitrosti rasti) v obdobju izpostavljanja. Iz povprečnih specifičnih hitrosti rasti, zabeleženih v nizu preskusnih raztopin, se določi koncentracija, ki je povzročila navedeno x-odstotno zaviranje hitrosti rasti (npr. 50-odstotno); ta koncentracija se izrazi kot E_rC_x (npr. E_rC_{50}).

7. Dodatna spremenljivka odziva, ki se uporablja v tej preskusni metodi, je prirast, ki jo je morda treba določiti, da se izpolnijo specifične zakonske zahteve nekaterih držav. Določi se kot vrednost merjenih spremenljivk na koncu obdobja izpostavljanja, od česar se odšteje vrednost merjenih spremenljivk na začetku obdobja izpostavljanja. Iz prirasti, zabeležene v nizu preskusnih raztopin, se določi koncentracija, ki je povzročila navedeno x-odstotno zaviranje prirasti (npr. 50-odstotno); ta koncentracija se izrazi kot E_yC_x (npr. E_yC_{50}).

▼M6

8. Poleg navedenega se lahko statistično določita tudi najnižja koncentracija z opaznim učinkom (LOEC) in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC).

PODATKI O PRESKUSNI KEMIKALIJI

9. Na voljo mora biti analitska metoda z zadostno občutljivostjo za kvantifikacijo kemikalije v preskusnem mediju.

10. Podatki o preskusni kemikaliji, ki so morda uporabni za določitev preskusnih pogojev, so med drugim strukturna formula, čistost, topnost v vodi, obstojnost v vodi in na svetlobi, pK_a, K_{ow}, parni tlak in biorazgradljivost. Topnost v vodi in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so v časovnem obdobju preskusa verjetne bistvene izgube preskusne kemikalije. To pripomore k odločitvi o uvedbi posameznih postopkov za nadzorovanje takšnih izgub. Če so podatki o topnosti in obstojnosti preskusne kemikalije negotovi, je priporočljivo, da se te vrednosti določijo v pogojih preskusa, tj. v gojišču, pri temperaturi in režimu osvetljevanja, ki se uporabijo v preskusu.

11. Kadar je zlasti pomembno nadzorovanje vrednosti pH preskusnega medija, npr. pri preskušanju kovin ali kemikalij, ki so hidrolitično neobstojne, je priporočljivo dodajanje pufra v gojišče (glej odstavek 21). Več smernic za preskusne kemikalije s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, zaradi katerih je preskušanje oteženo, je navedenih v (8).

VELJAVNOST PRESKUSA

12. Za veljavnost preskusa mora biti podvojitveni čas števila listov v kontrolnem vzorcu krajši od 2,5 dni (60 ur), kar ustreza približno sedemkratnemu povečanju v sedmih dneh in povprečni specifični hitrosti rasti 0,275 dan^{-1}. Ta kriterij je mogoče doseči z mediji in preskusnimi pogoji, ki so opisani v tej preskusni metodi, ter statičnim preskusnim režimom (5). Pričakovati je, da bo ta kriterij dosegljiv tudi v polstatičnih in pretočnih pogojih preskusa. Izračun podvojitvenega časa je prikazan v odstavku 49.

REFERENČNA KEMIKALIJA

13. Referenčne kemikalije, kot je na primer 3,5-diklorofenol, ki se uporablja za mednarodni krožni preskus (7), se lahko preskušajo z namenom preverjanja preskusnega postopka. Referenčno kemikalijo je priporočljivo preskusiti najmanj dvakrat letno oz. vzporedno z določanjem strupenosti preskusne snovi, kadar se preskušanja opravljajo redkeje.

OPIS METODE

Naprava

14. Vsa oprema v stiku s preskusnimi mediji mora biti izdelana iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Steklovino za gojenje in preskušanje je treba očistiti kemijskih onesnaževal, ki bi se lahko sprala v preskusni medij; steklovina mora biti sterilna. Preskusne posode morajo biti dovolj široke, da listi posameznih kolonij v posodah kontrol rastejo brez prekrivanja do konca preskusa. Ni pomembno, ali se korenine dotikajo dna preskusnih posod, vendar je najmanjša priporočljiva globina vsake preskusne posode 20 mm, najmanjša priporočljiva prostornina vsake preskusne posode pa 100 ml. Če so te zahteve izpolnjene, izbira preskusnih posod ni ključna.

▼M6

Kot primerne so se izkazale steklene čaše, kristalizacijske posodice in steklene petrijevke ustreznih mer. Preskusne posode morajo biti pokrite, da se čim bolj zmanjšata izhlapevanje in nenamerna kontaminacija, hkrati pa se omogoči potrebna izmenjava zraka. Primerne preskusne posode in zlasti pokrovi ne smejo senčiti ali spremeniti spektralnih lastnosti svetlobe.

15. Kulture in preskusne posode se ne smejo hraniti skupaj. To je najbolje doseči z ločenimi okoljskimi gojitvenimi komorami, inkubatorji ali prostori. Omogočeno mora biti nadzorovanje osvetljenosti in temperature ter ohranjanje teh parametrov na konstantni ravni (glej odstavka 35 in 36).

Preskusni organizem

16. V tem preskusu se uporabi *Lemna gibba* ali *Lemna minor*. Kratki opisi vrst vodne leče, ki so bile uporabljene pri preskušanju strupenosti, so navedeni v Dodatku 2. Rastlinski material je možno dobiti iz zbirke kultur, drugega laboratorija ali na terenu. Če se rastlinski material odvzame na terenu, je treba rastline najmanj osem tednov pred uporabo ohranjati v kulturi v istem mediju, v kakršnem se uporablja za preskus. Terenska mesta, kjer se jemljejo začetne kulture, morajo biti brez očitnih virov kontaminacije. Če se kulture pridobijo iz drugega laboratorija ali zbirke kultur, jih je treba na podoben način ohranjati najmanj tri tedne. V poročilu je treba vedno navesti v preskusu uporabljen vir rastlinskega materiala ter vrsto in klon (če sta znana).

17. Uporabiti je treba monokulture, za katere se s prostim očesom oceni, da niso kontaminirane z drugimi organizmi, npr. algami in praživalmi. Zdrave rastline vrste *L. minor* bodo sestavljale kolonije, ki imajo od dva do pet listov. Zdrave kolonije vrste *L. gibba* pa lahko imajo do sedem listov.

18. Kakovost in enakomernost rastlin, ki se uporabijo v preskusu, bosta pomembno vplivali na izid preskusa, zato je treba rastline natančno izbrati. Uporabiti je treba mlade, hitrorastoče rastline brez vidnih lezij ali sprememb barve (kloroze). Kulture dobre kakovosti nakazuje visoka pojavnost kolonij, ki imajo najmanj dva lista. Veliko število posameznih listov kaže na okoljski stres, npr. omejitev hranil, in rastlinski material, katerega kulture se ne smejo uporabiti za preskušanje.

Gojenje

19. Kulture se lahko hranijo pri zmanjšani osvetljenosti in znižani temperaturi (4–10 °C), da se zmanjša pogostnost vzdrževanja kultur (npr. kadar se za neko obdobje ne načrtuje preskusov z vrsto *Lemna*). Podrobnosti gojenja so navedene v Dodatku 3. Kadar se pojavijo očitni znaki kontaminacije z algami ali drugimi organizmi, je morda treba podvzorec listov vodne leče površinsko sterilizirati ter nato prenesti v svež medij (glej Dodatek 3). V tem primeru je treba preostalo kontaminirano kulturo zavreči.

20. Najmanj sedem dni pred preskušanjem je treba zadostno število kolonij aseptično prenesti v svež sterilni medij in gojiti 7–10 dni v pogojih preskusa.

Preskusni medij

21. Kot je opisano spodaj, so za *Lemna minor* in *Lemna gibba* priporočeni različni mediji. Natančno je treba proučiti vključitev pufra v preskusni medij (MOPS (4-morfolinpropan sulfonska kislina, št. CAS: 1132-61-2) v medij za *L. minor* in $NaHCO_3$ v medij za *L. gibba*), kadar sumimo, da bi lahko reagiral s preskusno kemikalijo in vplival na izražanje njene strupenosti. Če so izpolnjena merila za veljavnost, je sprejemljiv tudi medij po Steinbergu (9).

▼M6

22. Za gojenje *L. minor* in preskušanje z *L. minor* je priporočljiva modifikacija gojišča za vodno lečo iz švedskega standarda (SIS). Sestava tega medija je navedena v Dodatku 4.

23. Za gojenje *L. gibba* in preskušanje z *L. gibba* je priporočljivo gojišče 20X – AAP, kot je opisano v Dodatku 4.

24. Za *L. minor* je primeren tudi medij po Steinbergu, kot je opisan v Dodatku 4, lahko pa se ga uporabi tudi za *L. gibba* pod pogojem, da so izpolnjena merila za veljavnost.

Preskusne raztopine

25. Preskusne raztopine se navadno pripravijo z razredčitvijo založnih raztopin. Založne raztopine preskusne kemikalije se običajno pripravijo z raztopitvijo kemikalije v gojišču.

26. Najvišja preskušana koncentracija preskusne kemikalije običajno ne sme preseči topnosti te kemikalije v vodi v pogojih preskusa. Vendar je treba opozoriti, da vrste *Lemna* plavajo na gladini in so lahko izpostavljene kemikalijam, ki se zbirajo na mejni ploskvi med vodo in zrakom (npr. slabo vodotopnim, hidrofobnim ali površinsko aktivnim kemikalijam). V takšnih pogojih bo izpostavitev posledica snovi, ki niso iz raztopine, in preskusne koncentracije lahko, odvisno od lastnosti preskusne kemikalije, presežejo topnost v vodi. Za preskusne kemikalije z majhno topnostjo v vodi bo morda treba pripraviti koncentrirano založno raztopino ali dispergirati kemikalijo s pomočjo organskega topila ali disperzijskega sredstva, da se omogoči dodajanje točnih količin preskusne kemikalije v preskusni medij ter da se olajša njeno razprševanje in raztapljanje. Čim bolj si je treba prizadevati, da se izognemo uporabi takšnih snovi. Uporaba pomožnih topil ali disperzijskih sredstev ne sme povzročiti fitotoksičnosti. Pogosto uporabljeni topili, ki ne povzročata fitotoksičnosti pri koncentracijah do 100 µl/l, sta na primer aceton in dimetilformamid. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba končno koncentracijo te snovi navesti v poročilu in jo ohranjati na najnižji ravni ($\leq$ 100 µl/l), in vse tretirane in kontrolne skupine morajo vsebovati enako koncentracijo topila ali disperzijskega sredstva. Več smernic o uporabi disperzijskih sredstev je na voljo v (8).

Preskusne in kontrolne skupine

27. Pri izbiri primernih preskusnih koncentracij pripomore predhodno poznavanje strupenosti preskusne kemikalije za vodno lečo, npr. podatki iz preskusa za določanje območja delovanja. V dokončnem preskusu strupenosti naj bi bilo običajno najmanj pet preskusnih koncentracij, ki so urejene v geometrijski vrsti. Geometrijsko razmerje med preskusnimi koncentracijami naj po možnosti ne presega 3,2, vendar je mogoče uporabiti večje vrednosti, če je krivulja koncentracija-odziv ravna. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Za vsako preskusno koncentracijo je treba uporabiti najmanj tri ponovitve.

28. Pri določevanju območja preskusnih koncentracij (pri ugotavljanju območja in/ali v dokončnem preskusu strupenosti) je treba proučiti naslednje možnosti:

— Za določitev EC_x z ustrezno ravnijo zaupanja morajo preskusne koncentracije oklepati vrednost EC_x. Če, na primer, ocenjujemo EC_{50}, mora biti najvišja preskusna koncentracija višja od vrednosti EC_{50}. Če vrednost EC_{50} leži zunaj območja preskusnih koncentracij, bodo povezani intervali zaupanja veliki in pravilna ocena statističnega ujemanja modela morda ne bo možna.

— Če je cilj določitev vrednosti LOEC/NOEC, mora biti najnižja preskusna koncentracija dovolj nizka, da rast ni bistveno manjša od rasti v kontrolni skupini. Poleg tega mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj

▼M6

visoka, da je rast bistveno manjša od rasti v kontrolni skupini. V nasprotnem primeru bo treba preskus ponoviti z drugačnim razponom koncentracij (razen če je najvišja koncentracija na meji topnosti ali najvišji zahtevani mejni koncentraciji, npr. 100 mg/l).

29. Vsak preskus mora vključevati kontrolne skupine, ki so sestavljene iz enakega hranilnega gojišča, števila listov in kolonij, okoljskih pogojev in postopkov, kot se uporabljajo za preskusne posode, vendar brez preskusne kemikalije. Če se uporablja pomožno topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba vključiti dodatno tretiranje kontrolne skupine s topilom/disperzijskim sredstvom, ki je prisotno v enaki koncentraciji kot v posodah s preskusno kemikalijo. Število ponovitvenih kontrolnih posod (in posod s topilom, če je smiselno) mora biti najmanj enako številu posod za vsako preskusno koncentracijo, idealno pa je, če je dvakrat večje.

30. Če določevanje vrednosti NOEC ni zahtevano, se načrt preskusa lahko spremeni tako, da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovitev na koncentracijo. Kljub temu morajo imeti kontrolne skupine najmanj tri ponovitve.

Izpostavljenost

31. Iz inokulacijske kulture se prenesejo kolonije, ki obsegajo od 2 do 4 vidne liste, in naključno določijo preskusnim posodam v aseptičnih pogojih. Vsaka preskusna posoda mora vsebovati skupno od 9 do 12 listov. Število listov in kolonij mora biti v vsaki preskusni posodi enako. Izkušnje, pridobljene s to metodo, in podatki iz krožnih preskusov kažejo, da tri ponovitve na tretiranje, pri čemer vsaka ponovitev na začetku vsebuje od 9 do 12 listov, zadostujejo za odkritje razlike v rasti med tretiranji, ki znaša približno 4–7 % zaviranja, izračunano na podlagi hitrosti rasti (10–15 % zaviranja, izračunano na podlagi prirasti) (7).

32. Za inkubator je treba pripraviti naključno porazdelitev položajev preskusnih posod, da se čim bolj zmanjša vpliv prostorskih razlik v temperaturi in obsevanosti. Pri beleženju opažanj se zahteva tudi blokovska zasnova oz. naključna prerazporeditev (ali pogostejše premeščanje) posod.

33. Če predhodni preskus obstojnosti kaže, da koncentracije preskusne kemikalije ni možno ohranjati (tj. izmerjena koncentracija pade pod 80 % začetno izmerjene koncentracije) v obdobju trajanja preskusa (7 dni), je priporočljiv polstatični režim preskusa. V tem primeru je treba kolonije najmanj dvakrat med preskusom (npr. 3. in 5. dan) izpostaviti sveže pripravljenim preskusnim in kontrolnim raztopinam. Pogostost izpostavitve svežemu mediju je odvisna od obstojnosti preskusne kemikalije: za ohranjanje približno konstantnih koncentracij zelo neobstojnih ali hlapnih kemikalij bo potrebna večja pogostnost. V določenih okoliščinah bo morda treba uporabiti pretočni postopek (8)(10).

34. Izpostavitev s foliarnim nanosom (pršenjem) ni obravnavana v tej preskusni metodi; namesto tega glej (11).

Pogoji inkubacije

35. Uporabiti je treba neprekinjeno toplo ali hladno belo fluorescentno osvetlitev, da je obsevanost v območju 85–135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$, če se meri v fotosintetsko aktivnem sevanju (400–700 nm) v točkah, ki so enako oddaljene od vira svetlobe kot listi vodne leče (enakovredno 6 500 – 10 000 luksom). Razlike v izbrani obsevanosti prek preskusnega območja ne smejo preseči ± 15 %. Metoda zaznavanja in merjenja svetlobe, zlasti vrsta tipala, vpliva na izmerjeno vrednost. Sferična tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad

▼M6

in pod ravnino merjenja) in „kosinusnih“ tipal (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad ravnino merjenja) so bolj primerna od enosmernih tipal in dajejo višje odčitke v primeru več točkovnih virov svetlobe, ki so takšne vrste, kot je opisano tu.

36. Temperatura v preskusnih posodah mora biti 24 °C ± 2 °C. Vrednost pH kontrolnega medija se med preskusom ne bi smela povečati za več kot 1,5 enote. Vendar odstopanje za več kot 1,5 enote ne razveljavi preskusa, če se dokaže, da preskus ustreza merilom za veljavnost. Posebno pozornost je treba posvetiti premiku vrednosti pH v posebnih primerih, ko se preskušajo neobstojne kemikalije ali kovine. Glej (8) za dodatne smernice.

Trajanje

37. Preskus se prekine 7 dni po prenosu rastlin v preskusne posode.

Meritve in analitske določitve

38. Ob začetku preskusa se prešteje in zabeleži število listov v preskusnih posodah, pri čemer je treba zajeti štrleče, razločno vidne liste. Število listov, ki so videti normalni ali nenormalni, je treba določiti na začetku preskusa, najmanj vsake 3 dni v obdobju izpostavljanja (tj. najmanj dvakrat v 7-dnevnem obdobju) in ob prekinitvi preskusa. Zabeležiti je treba spremembe v razvoju rastline, npr. v velikosti in videzu listov, indikacije nekroze, kloroze ali grbavosti, razpadanje kolonij ali izgubo zmožnosti plavanja na gladini ter spremembe dolžine korenin in videza. Zabeležiti je treba tudi bistvene značilnosti preskusnega medija (npr. prisotnost neraztopljenih snovi, rast alg v preskusni posodi).

39. Poleg določitev števila listov med preskusom je treba določiti tudi učinke preskusne kemikalije na eno (ali več) od naslednjih merjenih spremenljivk:

(i) skupno površino listov,

(ii) suho težo,

(iii) svežo težo.

40. Skupna površina listov ima prednost v tem, da jo je mogoče določiti za vsako preskusno in kontrolno posodo na začetku preskusa, med preskusom in na koncu preskusa. Suho ali svežo težo je treba določiti na začetku preskusa iz vzorca inokulacijske kulture, ki je reprezentativen za material, s katerim se preskus začne, in na koncu preskusa z rastlinskim materialom iz vsake preskusne in kontrolne posode. Če se površina listov ne izmeri, ima suha teža prednost pred svežo težo.

41. Skupna površina listov, suha teža in sveža teža se lahko izračunajo po naslednjih postopkih:

(i) *Skupna površina listov:* skupna površina listov vseh kolonij se lahko določi s slikovno analizo. Obris preskusne posode in rastlin je mogoče zajeti z videokamero (npr. z osvetlitvijo posode od spodaj) in nastalo sliko nato digitalizirati. S kalibracijo s ploskimi oblikami znane površine je mogoče določiti skupno površino listov v preskusni posodi. Paziti je treba, da se izključijo motnje, ki jih povzroča rob preskusne posode. Druga možnost, ki je delovno zahtevnejša, pa je fotografiranje preskusnih posod in rastlin, izrezovanje nastalih obrisov kolonij in določevanje njihove površine z analizatorjem površine listov ali milimetrskim papirjem. Druge tehnike (npr. razmerje teže papirja s površino obrisa kolonij in površine merske enote) so lahko tudi primerne.

▼**M6**

(ii) *Suha teža:* zberejo se vse kolonije iz vsake preskusne posode in se sperejo z destilirano ali deionizirano vodo. Kolonije se popivnajo, da se odstrani odvečna voda. Nato se posušijo pri 60 °C do konstantne teže. Vključiti je treba vse fragmente korenin. Suho težo je treba izraziti z natančnostjo najmanj 0,1 mg.

(iii) *Sveža teža:* vse kolonije se prenesejo v zatehtane epruvete iz polistirena (ali iz drugega inertnega materiala) z majhnimi (1 mm) odprtinami v zaobljenem dnu. Epruvete se nato pri sobni temperaturi 10 minut centrifugirajo pri 3 000 vrtljajih/minuto. Epruvete, ki vsebujejo sedaj posušene kolonije, se ponovno stehtajo, sveža teža pa se izračuna z odštevanjem mase prazne epruvete.

Pogostost meritev in analitskih določitev

42. Če se uporabi statična zasnova preskusa, je treba na začetku in na koncu preskusa izmeriti vrednost pH vsake obdelave. Če se uporabi polstatična zasnova preskusa, je treba vrednost pH izmeriti za vsako serijo „sveže“ preskusne raztopine pred obnovitvijo in za ustrezno „iztrošeno“ raztopino.

43. Obsevanost je treba meriti v rastni komori, inkubatorju ali prostoru v točkah, ki so enako oddaljene od vira svetlobe kot listi vodne leče. Obsevanost je treba izmeriti najmanj enkrat med preskusom. Najmanj dnevno je treba beležiti temperaturo medija v nadomestni posodi, ki je v enakih pogojih v rastni komori, inkubatorju ali sobi.

44. Med preskusom se v primernih časovnih razmikih določajo koncentracije preskusne kemikalije. V statičnih preskusih je treba določiti koncentracije najmanj na začetku in na koncu preskusa.

45. V polstatičnih preskusih se ne pričakuje, da bo koncentracija preskusne kemikalije ostala v območju ± 20 % nominalne koncentracije, zato je treba analizirati vse sveže pripravljene preskusne raztopine in enake raztopine pri vsaki obnovitvi (glej odstavek 33). Pri tistih preskusih, v katerih izmerjena začetna koncentracija preskusne kemikalije ni v območju ± 20 % nominalne koncentracije, vendar obstajajo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetne koncentracije), se lahko kemijske določitve opravijo le na najvišji in najnižji koncentraciji. V vseh primerih je treba določitev koncentracije preskusne kemikalije pred obnovitvijo opraviti le za eno ponovitev vsake preskusne koncentracije (ali združene vsebine posod posameznih ponovitev).

46. Če se uporabi pretočni preskus, je treba izvajati podoben režim vzorčenja, kakor je opisan za polstatične preskuse, vključno za analizo na začetku, na sredini in na koncu preskusa, če je smiselno. Vendar meritve „iztrošenih“ raztopin v tem primeru niso primerne. V preskusu te vrste je treba pretok redčila in preskusne kemikalije ali založne raztopine preskusne kemikalije preverjati dnevno.

47. Če so na voljo dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije zadovoljivo vzdrževale v območju ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ves čas preskusa, lahko analiza rezultatov temelji na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih. Če odklon od nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ni v območju ± 20 %, mora analiza rezultatov temeljiti na geometrijskem povprečju koncentracije med izpostavljanjem ali modelih, ki opisujejo zmanjševanje koncentracije preskusne kemikalije (8).

▼M6

Mejni preskus

48. V nekaterih okoliščinah, npr. kadar predhodni preskus pokaže, da preskusna kemikalija nima strupenih učinkov pri koncentracijah do 100 mg/l ali do svoje meje topnosti v preskusnem mediju (kar je nižje), se lahko izvede mejni preskus, ki vključuje primerjavo odzivov v kontrolni skupini in eni tretirani skupini (100 mg/l ali koncentracija, ki je enaka meji topnosti). Zelo se priporoča, da se ta preskus podpre z analizo koncentracije izpostavljanja. Vsi predhodni pogoji preskusa in merila za veljavnost veljajo tudi za mejni preskus, le število ponovitev v tretirani skupini je treba podvojiti. Rast v kontrolni in tretirani skupini je mogoče analizirati s statističnim preskusom za primerjavo sredin, npr. s t-preskusom.

PODATKI IN POROČANJE

Podvojitveni čas

49. Podvojitveni čas *(T_d)* števila listov in izpolnjevanje tega merila za veljavnost študije (odstavek 12) se določi po naslednji enačbi skupaj s podatki iz kontrolnih posod:

$$T_d = \ln 2/\mu,$$

pri čemer je μ povprečna specifična hitrost, določena, kot je opisano v odstavkih 54 in 55.

Spremenljivke odziva

50. Namen tega preskusa je določiti učinke preskusne kemikalije na vegetativno rast vrst rodu *Lemna*. Ta preskusna metoda opisuje dve spremenljivki odziva, saj imajo države članice različne preference in zakonske zahteve. Da bi bili rezultati preskusa sprejemljivi v vseh državah članicah, se morajo učinki ovrednotiti z obema spremenljivkama odziva, (a) in (b), ki sta opisani spodaj.

(a) *Povprečna specifična hitrost rasti:* ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi spremembe logaritmov števila listov in na osnovi spremembe logaritmov drugega merjenega parametra (skupne površine listov, suhe teže ali sveže teže) skozi čas (izražen v dnevih) v kontrolah in vsaki tretirani skupini. Včasih se to imenuje relativna hitrost rasti (12).

(b) *Prirast:* ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi spremembe števila listov in na osnovi spremembe drugega merjenega parametra (skupne površine listov, suhe teže ali sveže teže) v kontrolah in vsaki tretirani skupini.

51. Opozoriti je treba, da vrednosti strupenosti, ki se izračunajo iz teh dveh spremenljivk odziva, niso primerljive, kar je treba upoštevati pri uporabi rezultatov preskusa. Če se upoštevajo pogoji preskusa iz te preskusne metode, bodo vrednosti EC_x, ki temeljijo na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x), navadno višje od rezultatov, ki temeljijo na prirasti (E_yC_x), zaradi matematične osnove teh dveh pristopov. To se ne sme razlagati kot razlika v občutljivosti obeh spremenljivk odziva, temveč razlika enostavno izvira iz različne matematične narave vrednosti. Pojem povprečne specifične hitrosti rasti temelji na splošnem vzorcu eksponentne rasti vodne leče v nelimitiranih kulturah, ko se strupenost ocenjuje na osnovi učinkov na hitrost rasti brez odvisnosti od absolutne ravni specifične hitrosti rasti v kontrolni skupini, naklona krivulje koncentracija-odziv ali od trajanja preskusa. Nasprotno pa so rezultati, ki temeljijo na prirasti kot spremenljivki odziva, odvisni od vseh teh drugih spremenljivk. Vrednost E_yC_x je odvisna od specifične hitrosti rasti vrst vodne leče, uporabljenih v vsakem preskusu,

▼M6

in od maksimalne specifične hitrosti rasti, ki je lahko različna glede na vrsto in celo glede na klone. Ta spremenljivka odziva se ne sme uporabiti za primerjanje občutljivosti za strupene snovi med vrstami vodne leče ali celo med kloni. Z znanstvenega vidika ima uporaba povprečne specifične hitrosti rasti prednost pri ocenjevanju strupenosti, vendar so ocene strupenosti na osnovi prirasti vključene v to preskusno metodo, da se izpolnijo trenutne zakonske zahteve nekaterih držav.

52. Ocene strupenosti morajo temeljiti na številu listov in še eni dodatni merjeni spremenljivki (skupni površini listov, suhi teži ali sveži teži), saj lahko nekatere kemikalije bolj vplivajo na druge merjene spremenljivke kot na število listov. V primeru izračunavanja le števila listov te razlike ne bi zaznali.

53. Pri vsaki meritvi se število listov in vse druge zabeležene merjene spremenljivke, tj. skupna površina listov, suha teža ali sveža teža, predstavijo v preglednici skupaj s koncentracijami preskusne kemikalije. Naknadna analiza podatkov, npr. za oceno LOEC, NOEC ali EC_x, mora temeljiti na vrednostih posameznih ponovitev in ne na izračunanih povprečnih vrednostih vsake tretirane skupine.

Povprečna specifična hitrost rasti

54. Povprečna specifična hitrost rasti se za določeno obdobje za vsako ponovitev kontrole in tretirane skupine izračuna kot logaritemsko povečanje spremenljivk rasti – števila listov in še druge merjene spremenljivke (skupna površina listov, suha teža ali sveža teža) – po spodnji enačbi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemer je:

— μ_{i-j}: povprečna specifična hitrost rasti od časa i do časa j,

— N_i: merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi v času i,

— N_j: merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi v času j,

— t: časovno obdobje od i do j.

Srednja vrednost hitrosti rasti skupaj z ocenami varianc se izračuna za vsako tretirano in kontrolno skupino.

55. Povprečna specifična hitrost rasti se izračuna za celotno preskusno obdobje (čas „i“ v zgornji enačbi pomeni začetek preskusa, čas „j“ pa konec preskusa). Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolno skupino se izračuna srednja vrednost povprečne specifične hitrosti rasti in ocenjena varianca. Ovrednoti se tudi presečna hitrost rasti, da se ocenijo učinki preskusne kemikalije, ki se pojavljajo med obdobjem izpostavljenosti (npr. pregledovanje logaritemsko pretvorjenih rastnih krivulj). Znatne razlike med presečno hitrostjo rasti in povprečno hitrostjo rasti kažejo odstopanje od konstantne eksponentne rasti in da je utemeljeno natančno preverjanje rastnih krivulj. Konservativni pristop v tem primeru je primerjanje specifičnih hitrosti rasti tretiranih kultur v času največjega zaviranja s specifičnimi hitrostmi rasti kontrolnih kultur v istem času.

56. Nato se lahko za vsako koncentracijo preskusne kemikalije (tretirano skupino) izračuna odstotek zaviranja hitrosti rasti (I_r) po naslednji enačbi:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

pri čemer je:

— % I_r: odstotek zaviranja povprečne specifične hitrosti rasti,

— μ_C: srednja vrednost za μ v kontrolni skupini,

— μ_T: srednja vrednost za μ v tretirani skupini.

Prirast

57. Učinki na prirast se določijo na osnovi dveh merjenih spremenljivk, števila listov in še ene druge merjene spremenljivke (skupne površine listov, suhe teže ali sveže teže), ki jo je mogoče določiti v vsaki preskusni posodi na začetku in na koncu preskusa. V primeru suhe teže ali sveže teže se določi začetna biomasa na osnovi vzorca listov, odvzetih iz iste šarže, kot se uporabi za inokulacijo preskusnih posod (glej odstavek 20). Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolno skupino se izračuna srednja vrednost prirasti in oceni varianca. Srednji odstotek zaviranja prirasti (% I_y) se lahko za vsako tretirano skupino izračuna po enačbi:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

pri čemer je:

— % I_y: odstotek zmanjšanja prirasti,

— b_C: končna biomasa minus začetna biomasa v kontrolni skupini,

— b_T: končna biomasa minus začetna biomasa v tretirani skupini.

Izdelava krivulj koncentracija-odziv

58. Izrisati je treba krivuljo koncentracija-odziv, ki prikazujejo srednjo vrednost odstotka zaviranja spremenljivke odziva (I_r ali I_y, ki se izračuna, kot je prikazano v odstavku 56 ali 57), in krivuljo logaritemsko pretvorjene koncentracije preskusne kemikalije.

Ocena vrednosti EC_x

59. Ocene vrednosti EC_x (npr. EC_{50}) morajo temeljiti na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x) in prirasti (E_yC_x), vsaka od teh vrednosti pa temelji na številu listov in še eni dodatni merjeni spremenljivki (skupni površini listov, suhi teži ali sveži teži). Postopek je takšen, ker obstajajo preskusne kemikalije, ki različno vplivajo na število listov in druge merjene spremenljivke. Želeni parametri strupenosti so torej štiri vrednosti EC_x za vsako izračunano raven zaviranja x: E_rC_x (število listov), E_rC_x (skupna površina listov, suha teža ali sveža teža), E_yC_x (število listov) in E_yC_x (skupna površina listov, suha teža ali sveža teža).

Statistični postopki

60. Cilj je količinsko ovrednotiti odziv na koncentracijo z regresijsko analizo. Lahko se uporabi tehtana linearna regresija, po tem ko se izvede linearizacijska pretvorba podatkov o odzivu, na primer v verjetnostnih ali logaritemskih ali Weibullovih enotah (13), vendar so nelinearni regresijski postopki prednostne metode, ki bolje obravnavajo neizogibne podatkovne nepravilnosti in odklone od enakomerne porazdelitve. Če se te nepravilnosti približujejo ničelnemu ali popolnemu zaviranju, se lahko s pretvorbo povečajo in ovirajo analizo (13). Opozoriti je treba, da so standardne metode analize probit, analize logit ali Weibullove pretvorbe namenjene uporabi na kvantnih

▼M6

podatkih (npr. umrljivost ali preživetje), zato jih je treba prilagoditi za uporabo na podatkih o hitrosti rasti ali prirasti. Specifični postopki za določevanje vrednosti EC_x iz kontinuiranih podatkov so na voljo v (14), (15) in (16).

61. Za vsako analizirano spremenljivko odziva se izračuna točkovna ocena vrednosti EC_x, pri čemer se uporabi razmerje med odzivom in koncentracijo. Kadar je to mogoče, se za vsako oceno določijo 95-odstotne meje zaupanja. Grafično ali statistično je treba določiti ustreznost prileganja podatkov odziva na regresijski model. Regresijska analiza se mora opraviti na odzivih posameznih ponovitev in ne na srednjih vrednostih tretiranih skupin.

62. Ocene EC_{50} in meje zaupanja se prav tako lahko pridobijo z uporabo linearne interpolacije z metodo vezanja (17), če so razpoložljivi regresijski modeli/metode za podatke neustrezni.

63. Za oceno LOEC in zato tudi NOEC je treba primerjati srednje vrednosti tretiranih skupin s tehnikami analize variance (ANOVA). Srednja vrednost za vsako koncentracijo se nato primerja s srednjo vrednostjo kontrole z ustrezno metodo večkratne primerjave ali trendnostnega preskusa. Uporabna sta lahko Dunnettov ali Williamsov preskus (18)(19)(20)(21). Treba je ugotoviti, ali velja domneva homogenosti variance v analizi variance. Ta ocena se lahko izvede grafično ali s formalnim preskusom (22). Primerna preskusa sta preskus po Levenu ali preskus po Bartlettu. Če domneva homogenosti variance ni izpolnjena, lahko to odpravimo z logaritemsko pretvorbo podatkov. Če je heterogenost variance skrajna in je ni mogoče odpraviti s pretvorbo, je treba proučiti možnosti analize z metodami, kot so večstopenjski trendnostni preskusi po Jonkheeru. Dodatna navodila o določanju NOEC so navedena v (16).

64. Nedavni razvoj znanosti je privedel do priporočila o opuščanju koncepta NOEC in njegovi zamenjavi z regresijsko določenimi točkovnimi ocenami EC_x. Za ta preskus z vodno lečo ustrezna vrednost x še ni določena. Zdi se, da je primerno območje od 10 do 20 % (odvisno od izbrane spremenljivke odziva), in po možnosti naj se poroča o EC_{10} in EC_{20}.

Poročanje

65. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— fizične značilnosti in fizikalno-kemijske lastnosti, vključno z mejo topnosti v vodi,

— kemijski identifikacijski podatki (npr. številka CAS), vključno s čistostjo (nečistote).

Preskusne vrste:

— znanstveno ime, klon (če je znan) in vir.

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (statični, polstatični ali pretočni),

— podatki o začetku preskusa in njegovo trajanje,

— preskusni medij,

— opis načrta poskusa: preskusne posode in pokrovi, volumni raztopin, število kolonij in listov na preskusno posodo na začetku preskusa,

— preskusne koncentracije (nominalne in izmerjene, kot je smiselno) in število ponovitev na posamezno koncentracijo,

▼**M6**

— metode priprave založnih in preskusnih raztopin, vključno z uporabo kakršnih koli topil ali disperzivnih sredstev,

— temperatura med preskusom,

— vir svetlobe, obsevanost in homogenost svetlobe,

— vrednosti pH preskusnega in kontrolnega medija,

— koncentracije preskusne kemikalije in analizna metoda z ustreznimi podatki za vrednotenje kakovosti (validacijske študije, standardni odkloni in meje zaupanja analiz),

— metode za določevanje števila listov in drugih merjenih spremenljivk, npr. suhe teže, sveže teže ali površine listov,

— vsa odstopanja od te preskusne metode.

Rezultati:

— neobdelani podatki: število listov in druge merjene spremenljivke v vsaki preskusni in kontrolni posodi za vsa opazovanja in analize,

— srednje vrednosti in standardni odkloni za vsako merjeno spremenljivko,

— rastne krivulje za vsako koncentracijo (priporočljivo z logaritemsko pretvorjeno merjeno spremenljivko, glej odstavek 55),

— podvojitveni čas/hitrost rasti v kontroli na podlagi števila listov,

— izračunane spremenljivke odziva za vsako tretirano ponovitev, s srednjimi vrednostmi in koeficienti variacij za ponovitve,

— grafična predstavitev razmerja koncentracija-učinek,

— ocene strupenih končnih točk za spremenljivke odziva, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, in pripadajoči intervali zaupanja. Vrednosti LOEC in/ali NOEC, če sta izračunani, in statistične metode za njuno določitev,

— če je bila uporabljena analiza variance, velikost opaženega učinka (npr. najmanj pomembna razlika),

— vsako spodbujanje rasti, ki se je pokazalo pri katerem koli tretiranju,

— kakršni koli vidni znaki fitotoksičnosti ter opažanja preskusne raztopine,

— razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izvirajo iz odstopanj od te preskusne metode.

LITERATURA

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). str. 733–742. V: Annual Book of ASTM Standards. Zvezek 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8 str.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 str.

(4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 str. (v švedščini).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 str.

(6) Environment Canada. (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series, št. 145.

(7) Sims, I., Whitehouse, P., in Lacey, R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 23. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(9) Mednarodna organizacija za standardizacijo. ISO DIS 20079. Kakovost vode – Določevanje toksičnih učinkov sestavin vode in odpadnih voda na vodno lečo (*Lemna minor*) – Preskus zaviranja rasti vodne leče.

(10) Walbridge, C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report, št. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart, W. L., Billeck, B. N., in Baron, C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353–359.

(12) Huebert, D. B., in Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481–483.

(13) Christensen, E. R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713–718.

(14) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O., in Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157–167.

(15) Bruce, R. D., in Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485–1494.

(16) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(17) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096–1121.

(19) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(20) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(21) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain, P., in Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Za namene te preskusne metode se uporabljajo naslednje opredelitve in okrajšave:

Biomasa je suha teža žive snovi, prisotne v populaciji. V tem preskusu se kot nadomestek za biomaso običajno meri število listov oziroma površina listov, zato se izraz „biomasa“ nanaša tudi na meritve teh nadomestkov.

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

Kloroza je porumenelost listnega tkiva.

Klon je organizem ali celica, ki se z nespolnim razmnoževanjem razvije iz enega organizma. Zato so osebki iz istega klona gensko identični.

Kolonija je skupek materinskih in hčerinskih listov (navadno od 2 do 4), ki so pritrjeni eden na drugega. V nekaterih primerih jo imenujemo tudi rastlina.

EC_x je koncentracija preskusne snovi, raztopljene v preskusnem mediju, katere rezultat je x-odstotno (npr. 50-odstotno) zmanjšanje rasti organizma *Lemna* v ustreznem obdobju izpostavljenosti (navesti v primeru odstopanja od polnega ali običajnega trajanja preskusa). Za nedvoumno označitev vrednosti EC, pridobljene iz hitrosti rasti ali prirasti, se uporabi simbol „E_rC“ za hitrost rasti in simbol „E_yC“ za prirast, sledi pa merjena spremenljivka, npr. E_rC (število listov).

Pretočni preskus je preskus, v katerem se preskusna raztopina neprekinjeno menja.

List je posamezna/ena „listu podobna“ struktura rastline vodne leče. Je najmanjša enota, tj. osebek, ki je zmožen razmnoževanja.

Grbavost pomeni liste, ki so grbasti ali otekli.

Rast je povečanje merjene spremenljivke, npr. števila listov, suhe teže, mokre teže ali površine listov, v času preskusa.

Hitrost rasti (povprečna specifična hitrost rasti) je logaritemsko povečanje biomase v obdobju izpostavljenosti.

Najnižja koncentracija z opaznim učinkom (LOEC) je najnižja preskušena koncentracija kemikalije, pri kateri je opaziti statistično značilen učinek zmanjšanja rasti (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo v navedenem obdobju izpostavljenosti. Vendar morajo imeti vse koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni možno izpolniti, je treba podrobno pojasniti izbiro LOEC (in s tem NOEC).

Merjene spremenljivke so vse vrste spremenljivk, ki se merijo, da se izrazi končna točka preskusa z eno ali več različnimi spremenljivkami odziva. V tej metodi so merjene spremenljivke število listov, površina listov, sveža teža in suha teža.

Monokultura je kultura z eno rastlinsko vrsto.

Nekroza je odmrlo (tj. belo ali z vodo prepojeno) listno tkivo.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskušena koncentracija neposredno pod vrednostjo LOEC.

Fenotip so opazne lastnosti organizma, ki jih določajo njegovi geni v interakciji z okoljem.

Spremenljivke odziva so spremenljivke za oceno strupenosti, ki so izpeljane iz katere koli merjene spremenljivke, za opis biomase z različnimi postopki izračuna. V tej preskusni metodi sta hitrost rasti in prirast spremenljivki odziva, ki sta izpeljani iz merjenih spremenljivk, kot so število listov, površina listov, sveža teža in suha teža.

▼M6

Polstatični (obnovitveni) preskus je preskus, v katerem se preskusna raztopina v danih časovnih razmikih med preskusom redno menja.

Statični preskus je preskusna metoda, v kateri se preskusna raztopina med preskusom ne obnavlja.

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Končna točka preskusa opisuje splošen dejavnik, ki ga preskusna kemikalija spremeni relativno glede na kontrolni vzorec in je cilj preskusa. V tej preskusni metodi je končna točka zaviranje rasti, ki ga lahko izrazimo z različnimi spremenljivkami odziva, katere temeljijo na eni ali več merjenih spremenljivk.

Preskusni medij je popolnoma sintetično gojišče, na katerem preskusne rastline rastejo ob izpostavitvi preskusni kemikaliji. Običajno se preskusna kemikalija raztopi v preskusnem mediju.

Prirast je vrednost merjene spremenljivke za izražanje biomase na koncu obdobja izpostavljenosti, od česar se odšteje vrednost merjene spremenljivke na začetku obdobja izpostavljenosti.

▼M6

Dodatek 2

Opis vrst *Lemna*

Vodne rastline vrst *Lemna*, ki se običajno imenujejo vodna leča, pripada družini Lemnaceae, v kateri je v štiri rodove razvrščenih več vrst z vsega sveta. Njihov različni videz in taksonomija sta podrobno opisana (1)(2). Vrsti *Lemna gibba* in *L. minor* sta značilni iz zmernega podnebja in se pogosto uporabljata v preskusih strupenosti. Diskoidna stebla (listi) obeh vrst plavajo na površini vode ali pa so potopljena, iz središča spodnje površine vsakega lista pa izhaja zelo tanka korenina. Vrste *Lemna* redko cvetijo, rastline pa se razmnožujejo z vegetativnim ustvarjanjem novih listov (3). V primerjavi s starejšimi rastlinami so mlajše bolj blede barve, imajo krajše korenine, sestavljene pa so iz dveh ali treh listov različnih velikosti. Zaradi majhnosti, preproste strukture, nespolnega razmnoževanja in kratkega generacijskega časa so rastline vrst *Lemna* zelo primerne za laboratorijsko preskušanje (4)(5).

Zaradi verjetnih variacij med vrstami glede občutljivosti so veljavne le primerjave občutljivosti znotraj vrste.

Primeri vrst *Lemna*, uporabljenih za preskušanje: viri o vrsti

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8 str.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 str.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 str. (v švedščini).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). str. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8 str.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959–1969.

Lemna perpusilla : Clark, J. R., idr. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481–483.

Lemna valdiviana : Hutchinson, T. C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102–2111.

Viri vrst *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2
Telefon: + 1 4169783641
Telefaks:+1 4169785878
E-naslov: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
Združene države Amerike
Telefon: + 1 9195157572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Stockholm
Švedska
Telefon: + 46 86747240
Telefaks: + 46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Nemčija
E-naslov: lemna@uba.de

LITERATURA

(1) Hillman, W. S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221–287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Švica.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds *(Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1–14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7–22.

▼M6

Dodatek 3

Vzdrževanje založne kulture

Založne kulture je mogoče dlje časa vzdrževati pri nižjih temperaturah (4–10 °C), ne da bi jih bilo treba ponovno pripravljati. Gojišče za vrste *Lemna* je lahko enako kot gojišče, uporabljeno za preskušanje, za založne kulture pa je mogoče uporabiti druga s hranili bogata gojišča.

Z aseptično tehniko se več mladih, svetlo zelenih rastlin redno odstranjuje in prenaša v nove posode za gojenje, ki vsebujejo sveže gojišče. V predlaganih ohlajenih pogojih je presajanje mogoče izvesti v časovnih razmikih, ki trajajo do tri mesece.

Uporabiti je treba kemično čiste (v kislini oprane) in sterilne steklene posode za gojenje ter z njimi ravnati po aseptičnih metodah. Če pride do kontaminacije založne kulture, npr. z algami ali glivami, je treba z ustreznimi ukrepi odstraniti kontaminirajoče organizme. Pri algah in večini drugih kontaminirajočih organizmov je to mogoče doseči s sterilizacijo površine. Odvzame se vzorec kontaminiranega rastlinskega materiala in odrežejo se korenine. Nato se material močno stresa v čisti vodi, nato pa se potopi v 0,5-odstotno (v/v) raztopino, kar naj traja od 30 sekund do 5 minut. Rastlinski material se nato splakne s sterilno vodo in v več šaržah prenese v posode za gojenje s svežim gojiščem. Zaradi te obdelave bo veliko listov odmrlo, še posebej pri daljših obdobjih izpostavljenosti, nekaj preživelih pa bo navadno nekontaminiranih. Z njimi je nato mogoče ponovno inokulirati nove kulture.

▼**M6**

Dodatek 4

Gojišča

Za *L. minor* in *L. gibba* se priporočajo različna gojišča. Za *L. minor* se priporoča prilagojeno gojišče po švedskem standardu (SIS), za *L. gibba*, pa se priporoča gojišče 20X AAP. Spodaj sta opisani sestavi obeh gojišč. Pri pripravi teh gojišč je treba uporabiti kemikalije s čistostjo reagenta ali analitsko čiste kemikalije in deionizirano vodo.

Gojišče za vrsto *Lemna* po švedskem standardu (SIS)

— Založne raztopine I–V se sterilizirajo z avtoklaviranjem (120 °C, 15 minut) ali z membransko filtracijo (velikost por približno 0,2 μm).

— Založna raztopina VI (in neobvezna VII) se sterilizira samo z membransko filtracijo in se je ne sme avtoklavirati.

— Sterilne založne raztopine je treba hraniti v hladnem in temnem prostoru. Založne raztopine I–V je treba zavreči po šestih mesecih, založna raztopina VI (in neobvezna VII) pa ima rok uporabnosti en mesec.

Št. založne raztopine:	Snov	Koncentracija v založni raztopini (g/l)	Koncentracija v pripravljenem gojišču (mg/ · l)	Pripravljeno gojišče	
				element	koncentracija (mg/ · l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3. 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (pufer)	490	490	—	—

Za pripravo enega litra gojišča SIS se 900 ml deionizirane vode doda naslednje:

▼**M6**

— 10 ml založne raztopine I,

— 5 ml založne raztopine II,

— 5 ml založne raztopine III,

— 5 ml založne raztopine IV,

— 1 ml založne raztopine V,

— 5 ml založne raztopine VI,

— 1 ml založne raztopine VII (neobvezno).*Opomba:* Za določene preskusne kemikalije je morda potrebna dodatna založna raztopina VII (pufer MOPS) (glej odstavek 11).

Vrednost pH se z 0,1 mola ali 1 molom HCl ali NaOH prilagodi na 6,5 ± 0,2, količina pa se z deionizirano vodo prilagodi na en liter.

Gojišče 20X AAP

Založne raztopine se pripravijo v sterilni destilirani ali deionizirani vodi.

Sterilne založne raztopine je treba hraniti v hladnem in temnem prostoru. Pri teh pogojih je rok uporabnosti založnih raztopin vsaj 6–8 tednov.

Za gojišče 20X-AAP se s kemikalijami čistosti reagenta pripravi pet založnih raztopin hranilnih snovi (A1, A2, A3, B in C). Za izdelavo gojišča se 20 ml vsake založne raztopine hranilnih snovi doda približno 850 ml deionizirane vode. Vrednost pH se z 0,1 mola ali 1 molom HCl ali NaOH prilagodi na 7,5 ± 0,1, količina pa se z deionizirano vodo prilagodi na en liter. Nato se gojišče filtrira skozi membranski filter z velikostjo por (približno) 0,2 μm v sterilno posodo.

Gojišče, namenjeno preskušanju, je treba pripraviti 1–2 dni pred uporabo, da se vrednost pH stabilizira. Pred uporabo je treba vrednost pH gojišča preveriti in po potrebi prilagoditi z dodajanjem 0,1 ali 1 mola NaOH ali HCl, kot je opisano zgoraj.

Št. založne raztopine:	Snov	Koncentracija v založni raztopini (g/ · l) (*)	Koncentracija v pripravljenem gojišču (mg/ · l) (*)	Pripravljeno gojišče	
				element	koncentracija (mg/ · l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Št. založne raztopine:	Snov	Koncentracija v založni raztopini (g/ · l) (*)	Koncentracija v pripravljenem gojišču (mg/ · l) (*)	Pripravljeno gojišče	
				element	koncentracija (mg/ · l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Razen, če je navedeno drugače.

Opomba: Teoretično ustrezna končna koncentracija bikarbonata (pri kateri ni treba znatno prilagajati vrednosti pH) je 15mg/l in ne 300 mg/l. Vendar pretekla uporaba gojišča 20X-AAP, vključno z uporabo v krožnem preskusu za to smernico, temelji na 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Gojišče po Steinbergu (po standardu ISO 20079)

Koncentracije in založne raztopine

Prilagojeno gojišče po Steinbergu se v standardu ISO 20079 uporablja le za vrsto *Lemna minor* (saj je v njem dovoljena le vrsta *Lemna minor*), preskusi pa so pokazali, da je mogoče dobre rezultate doseči tudi z vrsto *Lemna gibba*.

Pri pripravi gojišča je treba uporabiti kemikalije s čistostjo reagenta ali analitsko čiste kemikalije in deionizirano vodo.

Hranilno gojišče se pripravi iz založnih raztopin ali 10-kratno koncentriranega gojišča, ki omogoča največjo koncentracijo gojišča brez obarjanja.

Preglednica 1

Gojišče po Steinbergu s stabiliziranim pH (prilagojeno po Altenburgerju)

Element		Hranilno gojišče	
makroelementi	molska masa	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Element		Hranilno gojišče	
mikroelementi	molska masa	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dinatrijev dihidrat	372,24	1 500,00	4,03

Preglednica 2

Založne raztopine (makroelementi)

1. Makroelementi (50-kratno koncentrirani)	**g/l**
založna raztopina 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
založna raztopina 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
založna raztopina 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Preglednica 3

Založne raztopine (mikroelementi)

2. Mikroelementi (1 000-kratno koncentrirani)	**mg/l**
založna raztopina 4:	
H_3BO_3	120,0
založna raztopina 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
založna raztopina 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
založna raztopina 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
založna raztopina 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinatrijev dihidrat	1 500,00

— Založni raztopini 2 in 3 in ločeno založne raztopine od 4 do 7 se lahko združijo (z upoštevanjem zahtevanih koncentracij).

▼**M6**

— Za daljši rok uporabnosti založne raztopine 20 minut avtoklavirajte pri 121 °C ali pa jih namesto tega sterilno filtrirajte (pore naj merijo 0,2 μm). Za založno raztopino 8 je sterilna filtracija (s porami, ki merijo 0,2 μm) močno priporočljiva.

Priprava končne koncentracije gojišča po Steinbergu (prilagojenega)

— Dodajte 20 ml založnih raztopin 1, 2 in 3 (glej preglednico 2) približno 900 ml deionizirane vode, da preprečite obarjanje.

— Dodajte 1,0 ml založnih raztopin 4, 5, 6, 7 in 8 (glej preglednico 3).

— Vrednost pH mora biti v območju 5,5 ± 0,2 (prilagodite jo z dodajanjem kar najmanjše količine raztopine NaOH ali HCl).

— Z dodajanjem vode povečajte količino na 1 000 ml.

— Če so založne količine sterilizirane in če je uporabljena ustrezna voda, dodatna sterilizacija ni potrebna. Če je končni medij steriliziran, je treba po avtoklaviranju (pri 121 °C za 20 min) dodati založno raztopino 8.

Priprava 10-kratno koncentriranega gojišča po Steinbergu (prilagojenega) za vmesno skladiščenje

— Približno 30 mililitrom vode dodajte 20 ml založnih raztopin 1, 2 in 3 (glej preglednico 2), da preprečite obarjanje.

— Dodajte 1,0 ml založnih raztopin 4, 5, 6, 7 in 8 (glej preglednico 3). Z dodajanjem vode povečajte količino na 100 ml.

— Če so založne količine sterilizirane in če je uporabljena ustrezna voda, dodatna sterilizacija ni potrebna. Če je končni medij steriliziran, je treba po avtoklaviranju (pri 121 °C za 20 min) dodati založno raztopino 8.

— Vrednost pH medija (pri končni koncentraciji) mora biti 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 PRESKUS STRUPENOSTI S TRZAČAMI V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO USEDLINE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 218 (2004). Zasnovana je za oceno učinkov daljše izpostavljenosti kemikalijam na ličinke sladkovodne trzače *Chironomus* sp., ki živijo v usedlinah. Temelji na obstoječih protokolih za preskušanje strupenosti za *Chironomus riparius* in *Chironomus tentans*, ki so bili razviti v Evropi (1) (2) (3) in Severni Ameriki (4) (5) (6) (7) (8) ter krožno preskušeni (1) (6) (9). Uporabijo se lahko tudi druge dobro dokumentirane vrste trzače, npr. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Scenarij izpostavljenosti, uporabljen v tej preskusni metodi, je primešanje preskusne snovi v usedlino. Izbira ustreznega scenarija izpostavljenosti je odvisna od namena uporabe preskusa. Namen primešanja snovi v usedlino je simulirati nakopičene ravni kemikalij, ki ostajajo v usedlini. Ta sistem izpostavljenosti vključuje primešanje snovi v usedlino v preskusnem sistemu vode in usedline.

3. Snovi, ki jih je treba preskusiti v zvezi z organizmi, živečimi v usedlinah, se običajno v tem delu zelo dolgo obdržijo. Organizmi, živeči v usedlinah, so lahko izpostavljeni na številne načine. Relativni pomen vsakega načina izpostavljenosti in čas, da ta prispeva k skupnim strupenim učinkom, sta odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti zadevne kemikalije. Pri snoveh, ki se močno adsorbirajo (npr. z log K_{ow} > 5), ali snoveh, ki se kovalentno vežejo na usedlino, je lahko zaužitje kontaminirane hrane pomemben način izpostavljenosti. Da ne bi podcenili strupenosti visoko lipofilnih snovi, se lahko predvidi uporaba hrane, dodane usedlini pred uporabo preskusne snovi. Da bi se upoštevali vsi morebitni načini izpostavljenosti, je ta preskusna metoda osredotočena na dolgoročno izpostavljenost. Preskus za *C. riparius* in *C. yoshimatsui* traja 20 do 28 dni, za *C. tentans* pa 28 do 65 dni. Če so za določen namen potrebni kratkoročni podatki, na primer da se raziščejo učinki nestabilne kemikalije, se lahko dodatne ponovitve umaknejo po 10 dneh.

4. Izmerjene končne točke so skupno število preobraženih odraslih osebkov in čas do preobrazbe. Če so potrebni dodatni kratkoročni podatki, je priporočljivo, da se preživetje in rast ličink izmerita šele po 10-dnevnem obdobju, po potrebi z dodatnimi ponovitvami.

5. Priporoča se uporaba formulirane usedline. Ta ima pred naravnimi usedlinami več prednosti:

   — variabilnost pri poskusih je manjša, saj formulirana usedlina pomeni ponovljivo „standardizirano matrico“, poleg tega ni več treba iskati nekontaminiranih in čistih virov usedlin,

   — preskusi se lahko začnejo kadar koli, ne da bi se bilo treba ukvarjati s sezonsko variabilnostjo v preskusni usedlini, poleg tega usedline ni treba predhodno obdelati, da bi se odstranila domorodna favna; s formulirano usedlino se tudi znižajo stroški, povezani z zbiranjem zadostne količine usedline na terenu za rutinsko preskušanje,

   — uporaba formulirane usedline omogoča primerjave strupenosti in ustrezno razvrstitev snovi.

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

▼M4

NAČELO PRESKUSA

7. Ličinke trzače prvega stadija so izpostavljene razponu koncentracije preskusne kemikalije v sistemih vode in usedline. Preskusna snov se primeša v usedlino, ličinke prvega stadija pa se nato vnesejo v preskusne čaše, v katerih so bile koncentracije usedline in vode stabilizirane. Hitrost preobrazbe in razvoja trzač se izmeri ob koncu preskusa. Preživetje in teža ličink se lahko izmerita tudi po 10 dneh, če je to potrebno (z dodatnimi ponovitvami, kot je ustrezno). Ti podatki se analizirajo bodisi z regresijskim modelom, da se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje preobrazbe, ali preživetja, ali rasti ličink (npr. EC_{15}, EC_{50} itd.), bodisi s preskušanjem statističnih domnev za določitev NOEC/LOEC. Slednje zahteva primerjavo vrednosti učinkov s kontrolnimi vrednostmi, za kar se uporabijo statistični preskusi.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

8. Znani morajo biti vodotopnost preskusne snovi, njen parni tlak, izmerjeni ali izračunani koeficient porazdelitve v usedlini ter stabilnost v vodi in usedlini. Za določitev količine preskusne snovi v vodi nad usedlino, porni vodi in usedlini mora biti na voljo zanesljiva analitska metoda z znano in izpričano natančnostjo ter mejo zaznave. Koristni informaciji sta tudi strukturna formula in čistost preskusne snovi. Prav tako je koristno poznati obnašanje preskusne snovi v okolju (npr. disipacija, abiotska in biotska razgradnja itd.). Dodatne smernice za preskušanje snovi s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, zaradi katerih je preskus otežen, so navedene v (12).

REFERENČNE KEMIKALIJE

9. Redno se lahko preskušajo referenčne kemikalije, da se tako zagotavlja zanesljivost protokola za preskušanje in preskusnih pogojev. Primeri referenčnih strupenih snovi, ki so bile uspešno uporabljene v krožnih preskusih in potrditvenih raziskavah, so: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, kadmijev klorid in kalijev klorid (1) (2) (5) (6) (13).

VELJAVNOST PRESKUSA

10. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— preobrazba v kontrolnih posodah ob koncu preskusa mora biti vsaj 70-odstotna (1) (6),

— *C. riparius* in *C. yoshimatsui* v kontrolnih posodah se morajo v odrasle osebke preobraziti med 12. in 23. dnem po vnosu v posode; *C. tentans* potrebujejo 20 do 65 dni,

— ob koncu preskusa je treba v vsaki posodi izmeriti pH in koncentracijo raztopljenega kisika. Koncentracija kisika mora biti vsaj 60 % nasičenosti zraka (ASV) pri uporabljeni temperaturi, pH vode nad usedlino pa mora biti v vseh preskusnih posodah med 6 in 9,

— temperatura vode se ne sme razlikovati za več kot ± 1,0 °C; temperaturo vode bi bilo mogoče nadzorovati z izotermalnim prostorom; v takem primeru je treba temperaturo v prostoru potrjevati v ustreznih časovnih presledkih.

▼M4

OPIS METODE

Preskusne posode

11. Raziskava se izvaja v steklenih 600-mililitrskih čašah z 8-centimetrskim premerom. Primerne so tudi druge posode, vendar morajo zagotavljati primerno globino usedline in vode nad njo. Površina usedline mora biti dovolj velika, da zagotavlja 2 do 3 cm^2 na ličinko. Razmerje med debelino usedline in globino vode nad njo mora biti 1 : 4. Preskusne posode in druge naprave, ki bodo prišle v stik s preskusnim sistemom, morajo biti v celoti iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala (npr. teflona).

Izbira vrst

12. Če je mogoče, naj se v preskusu uporabi vrsta *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* je prav tako primerna, vendar je z njo težje delati in zahteva daljše preskusno obdobje. Uporabi se lahko tudi *Chironomus yohimatsui*. Podrobnosti o metodah gojenja za *Chironomus riparius* so navedene v Dodatku 2. Informacije o pogojih gojenja so na voljo tudi za druge vrste, npr. *Chironomus tentans* (4) in *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikacijo vrst je treba potrditi pred preskusom, ni pa to potrebno pred vsakim preskusom, če organizmi prihajajo iz internega gojišča.

Usedlina

13. Če je mogoče, je treba uporabiti formulirano usedlino (imenovano tudi rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina). Če se uporabi naravna usedlina, je treba določiti njene lastnosti (vsaj pH in vsebnost organskega ogljika, priporoča se tudi določitev drugih parametrov, kot sta razmerje C/N in granulometrija), poleg tega ne sme biti onesnažena in ne sme vsebovati drugih organizmov, ki bi lahko tekmovali s trzačami ali jih požrli. Prav tako se priporoča, naj se naravna usedlina pred uporabo v preskusu strupenosti s trzačami 7 dni kondicionira v enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu. Za uporabo v tem preskusu (1) (15) (16) se priporoča naslednja formulirana usedlina, ki temelji na umetni zemljini, uporabljeni v preskusni metodi C.8 (14):

(a) 4–5 % (suhe teže) šote: čim bližje vrednosti pH 5,5 do 6,0; pomembno je uporabiti fino mleto šoto v prahu (velikost delcev ≤ 1 mm), sušeno samo na zraku;

(b) 20 % (suhe teže) kaolinske gline (vsebnost kaolinita po možnosti nad 30 %);

(c) 75–76 % (suhe teže) kremenovega peska (prevladovati mora fini pesek, pri katerem je več kot 50 % delcev velikih 50 do 200 μm);

(d) doda se deionizirana voda, tako da je v končni mešanici vsebnost vlage 30- do 50-odstotna;

(e) doda se kemijsko čist kalcijev karbonat ($CaCO_3$), da se pH v končni mešanici usedline uravna na 7,0 ± 0,5. Vsebnost organskega ogljika v končni mešanici mora biti 2 % (± 0,5 %), uravnava pa se z ustreznimi količinami šote in peska v skladu s točkama (a) in (c).

14. Vir šote, kaolinske gline in peska mora biti znan. Preveriti je treba, da sestavine usedline niso kemično onesnažene (npr. da ne vsebujejo težkih kovin, organoklornih spojin, organofosfornih spojin itd.). Primer priprave formulirane usedline je opisan v Dodatku 3. Sprejemljiva je tudi mešanica suhih sestavin, če se dokaže, da se sestavine usedline po dodatku vode nad usedlino ne začnejo ločevati (npr. lebdenje šotnih delcev) in da je šota ali usedlina zadostno kondicionirana.

▼M4

Voda

15. Za preskusno vodo je primerna vsaka voda, ki ustreza kemijskim značilnostim sprejemljive vode za redčenje, ki so navedene v dodatkih 2 in 4. Za gojiščno vodo in preskusno vodo je sprejemljiva vsaka primerna voda, naravna voda (površinska ali podzemna voda), obdelana voda (glej Dodatek 2) ali deklorirana vodovodna voda, če trzače čas gojenja in preskušanja v njej preživijo brez znakov stresa. Na začetku preskusa mora biti pH preskusne vode med 6 in 9, skupna trdota pa ne sme biti višja od 400 mg/l kot $CaCO_3$. Če se domneva, da bo prišlo do interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno snovjo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto (v takem primeru se torej ne sme uporabiti medij Elendt M4). Ves čas raziskave je treba uporabljati isto vrsto vode. Lastnosti vode, navedene v Dodatku 4, je treba izmeriti vsaj dvakrat na leto ali kadar se sumi, da so se morda te lastnosti bistveno spremenile.

Založne raztopine – usedline s primešano preskusno snovjo

16. Usedline s primešano preskusno snovjo izbrane koncentracije se običajno pripravijo z dodatkom raztopine preskusne snovi neposredno v usedlino. osnovna raztopina preskusne snovi, raztopljene v deionizirani vodi, se zmeša s formulirano usedlino z valjčnim mlinom, mešalnikom za krmo ali ročno. Če je preskusna snov slabo topna v vodi, se lahko raztopi v čim manjši količini ustreznega organskega topila (npr. heksana, acetona ali kloroforma). Ta raztopina se nato zmeša z 10 g finega kremenovega peska za eno preskusno posodo. Topilo je treba pustiti, da izhlapi, in mora biti v celoti odstranjeno iz peska; pesek se nato zmeša z ustrezno količino usedline na preskusno čašo. Za raztapljanje, razpršitev ali emulgiranje preskusne snovi se lahko uporabijo samo tista sredstva, ki hitro izhlapijo. Ne smemo pozabiti, da je treba pri pripravi usedline upoštevati količino peska, prinesenega z mešanico preskusne snovi in peska (tj. usedlino je torej treba pripraviti z manj peska). Paziti je treba, da je preskusna snov, dodana usedlini, v njej temeljito in enakomerno razporejena. Po potrebi se lahko analizirajo podvzorci, da se ugotovi stopnja homogenosti.

NAČRT PRESKUSA

17. Načrt preskusa se nanaša na izbiro števila preskusnih koncentracij in razmikov med njimi, število posod za vsako koncentracijo in število ličink na posodo. Opisani so načrti za točkovno oceno EC, oceno NOEC in izvedbo mejnega preskusa.

Načrt za regresijsko analizo

18. S koncentracijami, vključenimi v preskus, bi morala biti zajeta efektivna koncentracija (npr. EC_{15}, EC_{50}) in razpon koncentracije, v katerem je zanimiv vpliv preskusne snovi. Na splošno se natančnost in zlasti veljavnost, ki ju je mogoče doseči pri ocenah efektivnih koncentracij (EC_x), izboljšata, kadar je efektivna koncentracija v okviru preskušanega razpona koncentracij. Izogibati se je treba ekstrapolaciji veliko pod najnižjo pozitivno koncentracijo ali veliko nad najvišjo koncentracijo. Kot pomoč pri izbiri razpona koncentracij, ki bo uporabljen (glej odstavek 27), se lahko izvede predhodni preskus za ugotavljanje razpona.

▼M4

19. Če je treba oceniti EC_x, je treba preskusiti vsaj 5 koncentracij in izvesti 3 ponovitve za vsako koncentracijo. Vsekakor je priporočljivo uporabiti dovolj preskusnih koncentracij, da se omogoči dobra ocena modela. Faktor med koncentracijami ne sme biti večji od 2 (izjema je dopustna, kadar naklon krivulje odmerek-učinek ni strm). Število ponovitev na posamezno posodo s preskusno snovjo se lahko zmanjša, če se poveča število preskusnih koncentracij z različnimi učinki. Povečanje števila ponovitev ali zmanjšanje velikosti razmikov med preskusnimi koncentracijami običajno vodi do ožjih intervalov zaupanja za preskus. Dodatne ponovitve so potrebne, če se ocenjujeta 10-dnevno preživetje in rast ličink.

Načrt za oceno NOEC/LOEC

20. Če je treba oceniti LOEC ali NOEC, bi bilo treba uporabiti pet preskusnih koncentracij in izvesti vsaj štiri ponovitve, faktor med koncentracijami pa ne sme biti večji od 2. Število ponovitev mora zadostovati, da se zagotovi ustrezna statistična vrednost za ugotovitev 20-odstotne razlike v primerjavi s kontrolno enoto pri 5-odstotni stopnji značilnosti ($p = 0,05$). Pri hitrosti razvoja je običajno ustrezna analiza variance (ANOVA), kot sta Dunnettov preskus in Williamsov preskus (17) (18) (19) (20). Pri koeficientu preobrazbe se lahko uporabijo Cochran-Armitageev preskus, Fisherjev eksaktni preskus (z Bonferronijevim popravkom) ali Mantel-Haenszelov preskus.

Mejni preskus

21. Če v predhodnem preskusu za ugotavljanje razpona ni bilo opaženih učinkov, se lahko opravi mejni preskus (ena preskusna koncentracija in kontrolna enota). Namen mejnega preskusa je izvesti preskus pri dovolj visoki koncentraciji, da lahko nosilci odločanja izključijo mogoče strupene učinke preskusne snovi, meja pa je določena pri koncentraciji, za katero ni pričakovati, da bi se pojavila v katerem koli primeru. Priporoča se 1 000 mg/kg (suhe teže). Običajno je potrebnih vsaj šest ponovitev za preskusne in kontrolne posode. Izkazati je treba ustrezno statistično vrednost za ugotovitev 20-odstotne razlike v primerjavi s kontrolno enoto pri 5-odstotni stopnji značilnosti ($p = 0,05$). Kar zadeva učinek na hitrost razvoja in težo, je t-test primerna statistična metoda, če podatki izpolnjujejo zahteve za ta preskus (normalnost, homogenost varianc). Če te zahteve niso izpolnjene, se lahko uporabi t-preskus za neenake variance ali neparametrični preskus, kot je Wilcoxon-Mann-Whitneyjev preskus. Pri koeficientu preobrazbe je primeren Fisherjev eksaktni preskus.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Priprava sistema vode in usedline, v katerem je preskusna snov primešana v usedlino

22. Za uporabo preskusne snovi (14) se priporoča postopek primešanja, opisan v preskusni metodi C.8: Strupenost za deževnike. Usedline s primešano preskusno snovjo se vnesejo v posode, nad usedlino pa se doda voda, da nastane volumensko razmerje med usedlino in vodo 1 : 4 (glej odstavka 11 in 15). Plast usedline mora biti debela 1,5 do 3 cm. Da se prepreči ločevanje sestavin usedline in ponovna suspenzija finega materiala med dodajanjem preskusne vode v vodni stolpec, se lahko usedlina med točenjem vode prekrije s plastičnim pokrovom, ki se takoj nato odstrani. Primerna so lahko tudi druga sredstva.

23. Preskusne posode je treba pokriti (npr. s steklenimi ploščami). Po potrebi se med raziskavo voda dotoči do prvotne količine, da se nadomesti izhlapela voda. Za to je treba uporabiti destilirano ali deionizirano vodo, da se prepreči kopičenje soli.

▼M4

Stabilizacija

24. Ko je usedlina s primešano preskusno snovjo in vodo nad njo pripravljena, je zaželeno, da se omogoči porazdelitev preskusne snovi iz vodne faze v usedlino (3) (4) (6) (13). To je po možnosti treba storiti v temperaturnih in prezračevalnih pogojih, ki bodo uporabljeni v preskusu. Ustrezen čas za vzpostavitev ravnotežja je odvisen od usedline in kemikalije, lahko pa traja od več ur do več dni in v redkih primerih do več tednov (4 do 5 tednov). Ker bi bil tako na voljo čas za razgradnjo številnih kemikalij, se na vzpostavitev ravnotežja ne sme čakati, ampak se za to priporoča 48-urno obdobje. Po koncu tega dodatnega obdobja za vzpostavitev ravnotežja je treba izmeriti koncentracijo preskusne snovi v vodi nad usedlino, porni vodi in usedlini vsaj pri najvišji in nižji koncentraciji (glej odstavek 38). Te analitske določitve preskusne snovi omogočajo izračun masne bilance in izražanje rezultatov na podlagi izmerjenih koncentracij.

Dodajanje preskusnih organizmov

25. Od 4 do 5 dni pred vnosom preskusnih organizmov v preskusne posode je treba iz gojišč vzeti jajčna legla in jih vstaviti v majhne posode v gojitvenem mediju. Uporabi se lahko starejši medij iz osnovne kulture ali sveže pripravljeni medij. Če se uporabi slednji, je treba v gojitveni medij dodati majhno količino hrane, npr. zelenih alg in/ali nekaj kapljic filtrata suspenzije iz fino mlete ribje hrane v kosmičih (glej Dodatek 2). Uporabiti je treba samo sveže odložena jajčna legla. Običajno se ličinke izležejo nekaj dni po tem, ko so bila jajčeca odložena (2 do 3 dni za *Chironomus riparius* pri 20 °C ter 1 do 4 dni za *Chironomus tentans* pri 23 °C in *Chironomus yoshimatsui* pri 25 °C), rast ličink pa poteka v 4 stadijih, od katerih vsak traja 4 do 8 dni. V preskusu je treba uporabiti ličinke prvega stadija (2 do 3 ali 1 do 4 dni po tem, ko se izležejo). Stadij trzač se lahko po možnosti preveri z merjenjem širine glave (6).

26. 20 ličink prvega stadija se s topo pipeto naključno vnese v vsako preskusno posodo, ki vsebuje usedlino s primešano preskusno snovjo in vodo. Med dodajanjem ličink v preskusne posode je treba ustaviti prezračevanje vode, ki se ne sme izvajati še 24 ur potem, ko so bile ličinke dodane (glej odstavka 25 in 32). Glede na uporabljeni načrt preskusa (glej odstavka 19 in 20) se za točkovno oceno EC uporabi vsaj 60 ličink na koncentracijo, za določitev NOEC pa 80.

Preskusne koncentracije

27. Preskus za ugotavljanje razpona je lahko koristen za določitev razpona koncentracij za končni preskus. Za ta namen se uporabi niz široko razmaknjenih koncentracij preskusne snovi. Da se zagotovi enaka gostota površine na trzačo, kot bo uporabljena za končni preskus, se trzače izpostavijo vsaki koncentraciji preskusne snovi za obdobje, ki omogoča oceno ustreznih preskusnih koncentracij, pri čemer ponovitve niso potrebne.

28. Preskusne koncentracije za končni preskus se določijo na podlagi rezultata preskusa za ugotavljanje razpona. Izbrati in uporabiti je treba vsaj pet koncentracij, kot je opisano v odstavkih 18 do 20.

▼M4

Kontrolne enote

29. V preskus je treba vključiti kontrolne posode, v katerih ni preskusne snovi, toda ki vsebujejo usedlino, z ustreznim številom ponovitev (glej odstavka 19 in 20). Če je bilo za aplikacijo preskusne snovi uporabljeno topilo (glej odstavek 16), je treba dodati kontrolno posodo, katere usedlina vsebuje tudi topilo.

Preskusni sistem

30. Uporabljajo se statični sistemi. Polstatični ali pretočni sistemi z občasnim ali kontinuiranim obnavljanjem vode nad usedlino se lahko uporabijo v izjemnih primerih, na primer če specifikacije kakovosti vode postanejo neprimerne za preskusni organizem ali vplivajo na kemijsko ravnotežje (npr. ravni raztopljenega kisika se preveč znižajo, koncentracija izločkov se preveč poviša ali minerali iztekajo iz usedline in vplivajo na pH in/ali trdoto vode). Vendar za izboljšanje kakovosti vode nad usedlino običajno zadoščajo in se prednostno uporabljajo druge metode, kot je prezračevanje.

Hrana

31. Ličinke je treba hraniti, po možnosti vsak dan ali vsaj trikrat na teden. Za mlade ličinke v prvih desetih dneh ustreza 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg za *C. yoshimatsui*) ribje hrane (suspenzija v vodi ali fino mleta hrana, npr. TetraMin ali TetraPhyll; glej podrobnosti v Dodatku 2) na ličinko na dan. Nekoliko več hrane bodo morda potrebovale starejše ličinke: za preostanek preskusa mora zadostovati 0,5–1 mg na ličinko na dan. Obrok hrane je treba zmanjšati v vseh preskusnih in kontrolnih posodah, če se opazi rast glivic ali smrtnost v kontrolnih posodah. Če razvoja glivic ni mogoče ustaviti, je treba preskus ponoviti. Kadar se preskušajo snovi, ki se močno adsorbirajo (npr. z log K_{ow} > 5), ali snovi, ki se kovalentno vežejo na usedlino, se lahko količina hrane, potrebna za zagotovitev preživetja in naravne rasti organizmov, doda formulirani usedlini pred obdobjem stabilizacije. Za to je treba namesto ribje hrane uporabiti rastlinski material, npr. dodatek 0,5 % (suhe teže) fino mletih listov npr. velike koprive (*Urtica dioica*), bele murve (*Morus alba*), plazeče detelje (*Trifolium repens*), špinače (*Spinacia oleracea*) ali drugega rastlinskega materiala (*Cerophyl* ali alfa celuloza).

Pogoji inkubacije

32. Zagotovi se rahlo prezračevanje vode nad usedlino v preskusnih posodah, po možnosti 24 ur po vnosu ličink, in se izvaja ves čas preskusa (paziti je treba, da koncentracija raztopljenega kisika ne pade pod 60 % ASV). Prezračevanje se zagotavlja prek steklene pasteurjeve pipete, pritrjene 2 do 3 cm nad plastjo usedline (tj. 1 ali nekaj mehurčkov/s). Kadar se preskušajo hlapne kemikalije, je mogoče razmisliti o tem, da se sistem vode in usedline ne bi prezračeval.

33. Preskus se izvaja pri konstantni temperaturi 20 °C (± 2 °C). Za *C. tentans* in *C. yoshimatsui* sta priporočeni temperaturi 23 °C oziroma 25 °C (± 2 °C). Uporablja se 16-urno obdobje osvetljenosti, jakost svetlobe pa mora biti 500 do 1 000 lux.

▼M4

Trajanje izpostavljenosti

34. Izpostavljenost se začne z vnosom ličink v posode s primešano preskusno snovjo in kontrolne posode. Najdaljši čas izpostavljenosti za *C. riparius* in *C. yoshimatsui* je 28 dni, za *C. tentans* pa 65 dni. Če se ličinke v odrasle osebke preobrazijo prej, se lahko preskus konča najmanj pet dni po preobrazbi zadnjega odraslega osebka v kontrolni posodi.

Opažanja

Preobrazba

35. Določita se čas razvoja in skupno število v celoti preobraženih samcev in samic trzače. Samce je mogoče preprosto prepoznati po pahljačastih tipalkah.

36. Preskusne posode je treba opazovati vsaj trikrat na teden, da se ugotovi kakršno koli neobičajno obnašanje (npr. zapuščanje usedline, nenavadno plavanje) v primerjavi s kontrolno posodo. V obdobju pričakovane preobrazbe je potrebno dnevno štetje preobraženih trzač. Spol in število v celoti preobraženih trzač se zapišeta dnevno. Po identifikaciji se trzače odstranijo iz posod. Vsa jajčna legla, odložena pred zaključkom preskusa, je treba evidentirati in nato odstraniti, da se prepreči vnovični vnos ličink v usedlino. Evidentira se tudi število vidnih bub, ki se niso preobrazile. Napotek za spremljanje preobrazbe je v Dodatku 5.

Rast in preživetje

37. Če je treba zagotoviti podatke o 10-dnevnem preživetju in rasti ličink, je treba na začetku vključiti dodatne preskusne posode, ki se lahko uporabijo pozneje. Usedlina iz teh dodatnih posod se preseje skozi sito z 250 μm velikimi luknjicami, da se zadržijo ličinke. Merili za pogin sta negibnost ali neodzivnost na mehanske dražljaje. Ličinke, ki ostanejo v usedlini, je prav tako treba šteti za mrtve (ličinke, ki so poginile na začetku preskusa, so morda razgradili mikrobi). Določi se suha teža (brez pepela) preživelih ličink na preskusno posodo in izračuna srednja suha teža posamezne ličinke na posodo. Koristno je določiti, v kateri stadij spadajo preživele ličinke; za to se lahko izmeri širina glave vsakega osebka.

Analitske meritve

Koncentracija preskusne snovi

38. Pred začetkom preskusa (tj. dodatkom ličink) se za analitsko določitev koncentracije preskusne snovi v usedlini odvzamejo vzorci usedline vsaj iz ene posode na posamezno obdelavo. Priporoča se, da se na začetku in koncu preskusa analizirajo vsaj vzorci vode nad usedlino, porne vode in usedline (glej odstavek 24), in sicer pri najvišji in nižji koncentraciji. Te določitve koncentracije preskusne snovi pokažejo obnašanje/porazdelitev preskusne snovi v sistemu vode in usedline.

39. Kadar se izvajajo vmesne meritve (npr. 7. dan) in če so za analize potrebni veliki vzorci, ki jih ni mogoče vzeti iz preskusnih posod, ne da bi to vplivalo na preskusni sistem, je treba analitske določitve izvesti na vzorcih iz dodatnih preskusnih posod, ki se obdelujejo enako (vključno s prisotnostjo preskusnih organizmov), vendar se za biološka opažanja ne uporabljajo.

▼M4

40. Za izolacijo intersticijske vode se priporoča 30-minutno centrifugiranje pri npr. 10 000 g in 4 °C. Če pa se za preskusno snov izkaže, da se ne adsorbira na filtre, je lahko sprejemljivo tudi filtriranje. V nekaterih primerih koncentracij v porni vodi zaradi premajhnega vzorca morda ne bo mogoče analizirati.

Fizikalno-kemijski parametri

41. Vrednost pH in temperaturo v preskusnih posodah je treba ustrezno meriti (glej odstavek 10). Trdoto in amonij je treba izmeriti v kontrolnih posodah in eni preskusni posodi pri najvišji koncentraciji na začetku in koncu preskusa.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

42. Namen tega preskusa je določiti učinek preskusne snovi na hitrost razvoja in skupno število v celoti preobraženih samcev in samic trzače oziroma, pri 10-dnevnem preskusu, učinke na preživetje in težo ličink. Če ni znakov o statistično različni občutljivosti spolov, se lahko rezultati za samce in samice za statistične analize združijo. Razlike v občutljivosti med spoloma je mogoče statistično oceniti, na primer s preskusom χ^2-r × 2. Po potrebi je treba po 10 dneh določiti preživetje ličink in srednjo suho težo posamezne ličinke na posodo.

43. Če je mogoče, se efektivne koncentracije, ki so izražene in temeljijo na suhi teži, izračunajo na podlagi izmerjenih koncentracij v usedlini na začetku preskusa (glej odstavek 38).

44. Za točkovno oceno EC_{50} ali druge EC_x se lahko statistični podatki po posodah uporabijo kot dejanske ponovitve. Pri izračunu intervala zaupanja za EC_x je treba upoštevati variabilnost med posodami ali pa dokazati, da je ta zanemarljiva. Če se model prilega po metodi najmanjših kvadratov, je treba statistične podatke po posameznih posodah transformirati, da se izboljša homogenost variance. Vendar je treba vrednosti EC_x izračunati po tem, ko so bili rezultati transformirani nazaj na prvotno vrednost.

45. Kadar je namen statistične analize določiti NOEC/LOEC s preskušanjem domnev, je treba upoštevati variabilnost med posodami, npr. z vgnezdeno ANOVO. Alternativno se lahko uporabijo robustnejši preskusi (21), kadar so običajne predpostavke ANOVE kršene.

Koeficient preobrazbe

46. Koeficient preobrazbe da odgovor „vse ali nič“ in se lahko analizira s Cochran-Armitageevim preskusom, uporabljenim regresivno (step-down), kadar se pričakuje monotono razmerje odmerek-učinek in so ti podatki v skladu s tem pričakovanjem. Če niso, se lahko uporabi Fisherjev eksaktni preskus ali Mantel-Haenszelov preskus z Bonferroni-Holmovimi popravljenimi p-vrednostmi. Če se izkaže, da je variabilnost med ponovitvami v okviru iste koncentracije večja, kot bi kazala binomska porazdelitev (pogosto imenovana „ekstra-binomska“ variacija), potem je treba uporabiti robustni Cochran-Armitageev preskus ali Fisherjev eksaktni preskus, kot je predlagano v (21).

▼M4

Vsota preobraženih trzač na posodo ne se določi in deli s številom vnesenih ličink na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

pri čemer je:

ER = koeficient preobrazbe,

n_e = število preobraženih trzač na posodo,

n_a = število vnesenih ličink na posodo.

47. Druga možnost, ki je najprimernejša za velike vzorce, kadar obstaja ekstra binomska varianca, je, da se koeficient preobrazbe obravnava kot zvezni odgovor in se uporabijo postopki, kot je Williamsov preskus, kadar se pričakuje monotono razmerje odmerek-učinek in kadar je to v skladu s temi podatki o koeficientu preobrazbe. Dunettov preskus je primeren, kadar monotonost ne drži. Velik vzorec je tu opredeljen kot število preobraženih osebkov in število nepreobraženih osebkov po posameznih ponovitvah (posodah), pri čemer je obojih več kot pet.

48. Za uporabo metod ANOVA je treba vrednosti ER najprej transformirati z arkus sinus-korensko transformacijo ali Freeman-Tukeyevo transformacijo, da se dobi približna normalna porazdelitev in da se variance izenačijo. Cochran-Armitageev preskus, Fisherjev eksaktni preskus (Bonferroni) ali Mantel-Haenszelov preskus se lahko uporabijo, kadar se uporabljajo absolutne pogostosti. Pri arkus sinus-korenski transformaciji se izračuna arkus sinus (sin^{-1}) kvadratnega korena ER.

49. Za koeficiente preobrazbe se vrednosti EC_x izračunajo z regresijsko analizo (ali npr. probit (22), logit, Weibull, ustrezno programsko opremo itd.). Če regresijska analiza ni uspešna (npr. kadar sta manj kot dva delna odgovora), se uporabijo druge neparametrične metode, kot sta drseče povprečje ali linearna interpolacija.

Hitrost razvoja

50. Srednji čas razvoja pomeni srednji časovni razpon med vnosom ličink (dan 0 preskusa) in preobrazbo poskusne kohorte trzač. (Za izračun dejanskega časa razvoja je treba upoštevati starost ličink ob vnosu.) Hitrost razvoja je obratna času razvoja (enota: 1/dan) in predstavlja tisti delež razvoja ličink, ki se zgodi na dan. Za oceno teh raziskav strupenosti v usedlini je primernejša hitrost razvoja, saj je njena varianca manjša, poleg tega je bolj homogena in bližje normalni porazdelitvi v primerjavi s časom razvoja. Zato so učinkoviti parametrični preskusi primernejši za hitrost razvoja kot za čas razvoja.Če se hitrost razvoja obravnava kot zvezni odgovor, se lahko vrednosti EC_x ocenijo z regresijsko analizo (npr. (23), (24)).

51. Za naslednje statistične preskuse se za število trzač, opaženih na dan opazovanja x, domneva, da so se preobrazile na sredini časovnega intervala med dnevom × in dnevom x – 1 (l = dolžina intervala opazovanja, običajno 1 dan). Srednja hitrost razvoja na posodo (x) se izračuna z enačbo:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

pri čemer je:

$\overline{x}$: srednja hitrost razvoja za posodo,

i: indeks intervala opazovanja,

m: največje število intervalov opazovanja,

f_i: število trzač, preobraženih v intervalu opazovanja i,

n_e: skupno število preobraženih trzač ob koncu poskusa, (= $\sum f_i$)

x_i: hitrost razvoja trzač, preobraženih v intervalu i.

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

pri čemer je:

day_i: dan opazovanja (dnevi od vnosa),

l_i: dolžina intervala opazovanja i (dnevi, običajno 1 dan).

Poročilo o preskusu

52. V poročilu o preskusu morajo biti navedene vsaj naslednje informacije:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje, in kjer je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (vodotopnost, parni tlak, porazdelitveni koeficient v tleh (ali v usedlini, če je na voljo), stabilnost v vodi itd.),

— kemijski identifikacijski podatki (splošno ime, kemijsko ime, strukturna formula, številka CAS itd.), vključno s čistostjo in analitsko metodo za količinsko določanje preskusne snovi.

Preskusne vrste:

— uporabljene preskusne živali: vrsta, znanstveno ime, vir organizmov in pogoji razmnoževanja,

— informacije o ravnanju z jajčnimi legli in ličinkami,

— starost preskusnih živali ob vnosu v preskusne posode.

Preskusni pogoji:

— uporabljena usedlina, tj. naravna ali formulirana,

— za naravno usedlino lokacija in opis mesta vzorčenja usedline, vključno, če je mogoče, s preteklim onesnaženjem; značilnosti: pH, vsebnost organskega ogljika, razmerje C/N in granulometrija (če je ustrezno),

— priprava formulirane usedline: sestavine in značilnosti (vsebnost organskega ogljika, pH, vlaga itd. na začetku preskusa),

— priprava preskusne vode (če se uporablja obdelana voda) in značilnosti (koncentracija kisika, pH, prevodnost, trdota itd. na začetku preskusa),

— globina usedline in vode nad njo,

— količina vode nad usedlino in porne vode; teža mokre usedline s porno vodo in brez nje,

▼M4

— preskusne posode (material in velikost),

— metoda primešanja preskusne snovi v usedlino: uporabljene preskusne koncentracije, število ponovitev in uporaba topila, če je bilo uporabljeno,

— faza stabilizacije za vzpostavitev ravnotežja sistema vode in usedline: trajanje in pogoji,

— pogoji inkubacije: temperatura, svetlobni ciklus in jakost svetlobe, prezračevanje (pogostost in jakost),

— podrobne informacije o hranjenju, vključno z vrsto hrane, pripravo, količino in načinom.

Rezultati:

— nazivne preskusne koncentracije, izmerjene preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določitev koncentracije preskusne snovi v preskusni posodi,

— kakovost vode v preskusnih posodah, tj. pH, temperatura, raztopljeni kisik, trdota in amonij,

— morebitna nadomestitev izhlapele preskusne vode,

— število preobraženih samcev in samic trzače na posodo in na dan,

— število ličink, ki se niso preobrazile v trzače, na posodo,

— srednja suha teža posamezne ličinke na posodo in po stadijih, če je ustrezno,

— delež preobrazbe na ponovitev in preskusno koncentracijo (združeni samci in samice trzače),

— srednja hitrost razvoja v celoti preobraženih trzač na ponovitev in stopnjo koncentracije (združeni samci in samice trzače),

— ocene strupenih končnih točk, npr. ECx (in s tem povezani intervali zaupanja), NOEC in/ali LOEC, ter statistične metode, uporabljene za njihovo določitev,

— obravnava rezultatov, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izvirajo iz odstopanj od te preskusne metode.

VIRI:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Uredila M. Streloke in H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming, R., idr. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Končno poročilo za Evropsko komisijo. Poročilo št.: EC 3738. Avgust 1994. WRc, Združeno kraljestvo.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Z delavnice WOSTA, ki je potekala na Nizozemskem.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, str. 1125–1241. V ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Zvezek 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Druga izdaja. EPA 600/R-99/064. Marec 2000. Sprememba prve izdaje iz junija 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani, D., Day, K. E., McLeay, D. J., in Kirby, R. S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

(11) Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Preskusna metoda C.8 iz te priloge, Strupenost za deževnike.

(15) Suedel, B. C., in Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

(16) Naylor, C., in Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(17) Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

(19) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(20) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

(21) Rao, J. N. K., in Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

(22) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

(23) Bruce in Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

(24) Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

formulirana usedlina ali rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina je zmes snovi, uporabljenih za posnemanje fizičnih sestavin naravne usedline;

voda nad usedlino je voda, ki se nalije nad usedlino v preskusni posodi;

intersticijska voda ali porna voda je voda, ki zavzema prostor med delci usedline in zemljine;

usedlina s primešano snovjo je usedlina, ki ji je bila dodana preskusna snov;

preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

Dodatek 2

Priporočila za gojenje *Chironomus riparius*

1. Ličinke *Chironomus* se lahko gojijo v kristalizirkah ali večjih vsebnikih. Na dno vsebnika se nanese tanka plast finega kremenovega peska (debela približno 5 do 10 mm). Za primeren substrat se je izkazal tudi kieselguhr (npr. Merck, Art 8117) (zadošča tanjša plast, debela samo nekaj mm). Nato se doda primerna voda do globine več cm. Vodo je treba po potrebi dotočiti, da se nadomestijo izgube zaradi izhlapevanja in prepreči izsušitev. Voda se po potrebi lahko zamenja. Zagotoviti je treba rahlo prezračevanje. Posode, v katerih se gojijo ličinke, morajo biti v primerni kletki, ki bo preprečila pobeg odraslih preobraženih osebkov. Kletka mora biti dovolj velika, da lahko preobraženi odrasli osebki rojijo, sicer se lahko zgodi, da ne bo parjenja (najmanjša velikost je približno 30 × 30 × 30 cm).

2. Kletke morajo biti v prostoru s sobno temperaturo ali prostoru s stalnim ozračjem pri 20 ± 2 °C s 16-urnim obdobjem svetlobe (jakost približno 1 000 lux) in 8-urno temo. Po poročilih lahko manj kot 60-odstotna relativna vlažnost zraka ovira razmnoževanje.

Voda za redčenje

3. Uporabi se lahko vsaka primerna naravna ali sintetična voda. Običajno se uporabljajo voda iz vodnjaka, deklorirana vodovodna voda in umetni mediji (npr. medij Elendt „M4“ ali „M7“, glej spodaj). Vodo je treba pred uporabo prezračiti. Voda za gojenje se lahko po potrebi obnovi, tako da se uporabljena voda iz gojitvenih posod skrbno pretoči ali izsesa, ne da bi pri tem uničili ovoj ličink.

Hranjenje ličink

4. Ličinke *Chironomus* je treba hraniti s približno 250 mg ribje hrane v kosmičih (TetraMin®, TetraPhyll® ali druga podobna zaščitena znamka ribje hrane) na posodo na dan. Hrana se lahko daje v obliki suhega mletega prahu ali kot suspenzija v vodi: 1,0 g hrane v kosmičih se doda 20 ml vode za redčenje in zmeša, da nastane homogena mešanica. Ta pripravek se lahko daje v količini približno 5 ml na posodo na dan (pred uporabo ga je treba pretresti). Starejše ličinke lahko dobijo več hrane.

5. Hranjenje se prilagaja kakovosti vode. Če gojitveni medij postane „moten“, je treba hranjenje zmanjšati. Dodajanje hrane je treba skrbno spremljati. Premalo hrane bo povzročilo selitev ličink v vodni stolpec, preveč hrane pa povečano mikrobno dejavnost in zmanjšane koncentracije kisika. Oboje lahko privede do počasnejše rasti.

6. Ko se pripravijo nove gojitvene posode, se lahko dodajo tudi celice nekaterih zelenih alg (npr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris)*.

Hranjenje preobraženih odraslih osebkov

7. Nekateri raziskovalci so predlagali, da se lahko kot hrana za odrasle preobražene osebke uporabi vatna blazinica, namočena v nasičeno raztopino saharoze.

▼M4

Preobrazba

8. Pri 20 ± 2 °C se bo preobrazba v odrasle osebke iz posod za gojenje ličink začela po približno 13 do 15 dneh. Samce je mogoče preprosto prepoznati po pahljačastih tipalkah.

Jajčna legla

9. Ko so v kletki za razmnoževanje odrasli osebki, je treba vse posode za gojenje ličink trikrat tedensko preveriti zaradi morebitnih odloženih želatinastih jajčnih legel, ki jih je treba previdno odstraniti. Prenesti jih je treba v majhno posodo, ki vsebuje vzorec vode za razmnoževanje. Jajčna legla se uporabijo za pripravo nove gojitvene posode (npr. 2 do 4 jajčna legla/posodo) ali za preskuse strupenosti.

10. Ličinke prvega stadija bi se morale izleči po 2 ali 3 dneh.

Priprava novih gojitvenih posod

11. Ko so gojišča vzpostavljena, bi moralo biti mogoče novo gojitveno posodo za ličinke pripraviti vsak teden ali manj pogosto, odvisno od zahtev preskušanja, stare posode pa odstraniti, ko se ličinke preobrazijo v odrasle osebke. S takim sistemom bo najpreprosteje zagotovljena redna oskrba z odraslimi osebki.

Priprava preskusnih raztopin „M4“ in „M7“

12. Elendt (1990) je opisal medij „M4“. Medij „M7“ se pripravi kot medij „M4“, z izjemo snovi, navedenih v preglednici 1, za katere so koncentracije pri „M7“ štirikrat nižje kot pri „M4“. Publikacija o mediju „M7“ je v pripravi (Elendt, osebno sporočilo). Preskusna raztopina se ne sme pripraviti po Elendt in Bias (1990), saj koncentracije $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 in K_2HPO_4, navedene za pripravo osnovnih raztopin, niso ustrezne.

Priprava medija „M7“

13. Vsaka osnovna raztopina (I) se pripravi posebej, sestavljena osnovna raztopina (II) pa se pripravi iz teh osnovnih raztopin (I) (glej preglednico 1). V 50 ml sestavljene osnovne raztopine (II), ki ji je dodana količina vsake osnovne raztopine makrohranilnih snovi, navedena v preglednici 2, se dolije deionizirana voda do 1 litra, da se pripravi medij „M7“. Založna raztopina vitaminov se pripravi tako, da se trije vitamini dodajo v deionizirano vodo, kot je navedeno v preglednici 3, 0,1 ml sestavljene osnovne raztopine vitaminov pa se doda končnemu mediju „M7“ malo pred uporabo. (Založna raztopina vitaminov se shranjuje zamrznjena v majhnih alikvotih.) Medij se prezračuje in stabilizira.

VIRI:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Uredila M. Streloke in H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Preglednica 1

Založne raztopine elementov v sledeh za medija M4 in M7

Založne raztopine (I)	Količina (mg) za pripravo 1 litra z deionizirano vodo	Za pripravo sestavljene osnovne raztopine (II): zmešajte naslednje količine (ml) osnovnih raztopin (I) in dopolnite do 1 litra z deionizirano vodo		Končne koncentracije v preskusnih raztopinah (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Te snovi se pri M4 in M7 razlikujejo, kot je navedeno zgoraj.
(2) Te raztopine se pripravijo posamezno, nato zlijejo skupaj in takoj avtoklavirajo.

Preglednica 2

Založne raztopine makrohranilnih snovi za medija M4 in M7

	Količina za pripravo 1 litra z deionizirano vodo (mg)	Količina osnovnih raztopin makrohranilnih snovi za pripravo medijev M4 in M7 (ml/l)	Končne koncentracije v preskusnih raztopinah M4 in M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Preglednica 3

Založna raztopina vitaminov za medija M4 in M7. Vse tri raztopine vitaminov so združene v eno.

	Količina za pripravo 1 litra z deionizirano vodo (mg)	Količina dodane osnovne raztopine vitaminov za pripravo medijev M4 in M7 (ml/l)	Končne koncentracije v preskusnih raztopinah M4 in M7 (mg/l)
Tiamin hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

VIRI:

Elendt, B. P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B. P. in Bias, W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Dodatek 3

PRIPRAVA FORMULIRANE USEDLINE

Sestava usedline

Sestava formulirane usedline mora biti naslednja:

Sestavina	Značilnosti	Delež suhe teže usedline v %
Šota	Šotni mah, čim bližje pH 5,5 do 6,0, brez vidnih ostankov rastlin, fino mlet (velikost delcev ≤ 1 mm) in sušen na zraku.	4–5
Kremenov pesek	Velikost zrn: > 50 % delcev mora biti velikih 50–200 μm.	75–76
Kaolinska glina	Vsebnost kaolinita ≥ 30 %.	20
Organski ogljik	Uravnava se z dodatkom šote in peska.	2 (± 0,5)
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, zdrobljen v prah, kemijsko čist.	0,05–0,1
Voda	Prevodnost ≤ 10 μS/cm.	30–50

Priprava

Šota se posuši na zraku in zmelje v fin prah. Pripravi se suspenzija potrebne količine šote v prahu v deionizirani vodi, za kar se uporabi visoko zmogljiva naprava za homogenizacijo. pH te suspenzije se s $CaCO_3$ uravna na 5,5 ± 0,5. Suspenzija se vsaj 2 dneva kondicionira z rahlim mešanjem pri 20 ± 2 °C, da se stabilizira pH in vzpostavi stabilna mikrobna komponenta. Vrednost pH se znova izmeri in mora biti 6,0 ± 0,5. Šotna suspenzija se nato zmeša z drugimi sestavinami (peskom in kaolinsko glino) in deionizirano vodo, da nastane homogena usedlina z vsebnostjo vode v razponu 30 do 50 % suhe teže usedline. pH končne mešanice se znova izmeri in po potrebi uravna na 6,5 do 7,5 s $CaCO_3$. Vzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in vsebnost organskega ogljika. Priporoča se, da se formulirana usedlina pred uporabo v preskusu strupenosti s trzačami 7 dni kondicionira v enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu.

Shranjevanje

Suhe sestavine za pripravo umetne usedline se lahko shranjujejo v suhem in hladnem prostoru pri sobni temperaturi. Formulirana (mokra) usedlina se pred uporabo v preskusu ne sme shranjevati. Uporabiti jo je treba takoj po 7-dnevnem obdobju kondicioniranja, s katerim se njena priprava konča.

VIRI:

Poglavje C.8 te priloge. Strupenost za deževnike.

Meller, M., Egeler, P., Rombke, J., Schallnass, H., Nagel, R., Streit, B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Dodatek 4

Kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje

Snov	Koncentracije
Delci	< 20 mg/l
Celotni organski ogljik	< 2 mg/l
Neionizirani amoniak	< 1 μg /l
Trdota kot $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Ostanek klora	< 10 μg /l
Skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/1
Skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/1
Skupni organski klor	< 25 ng/1

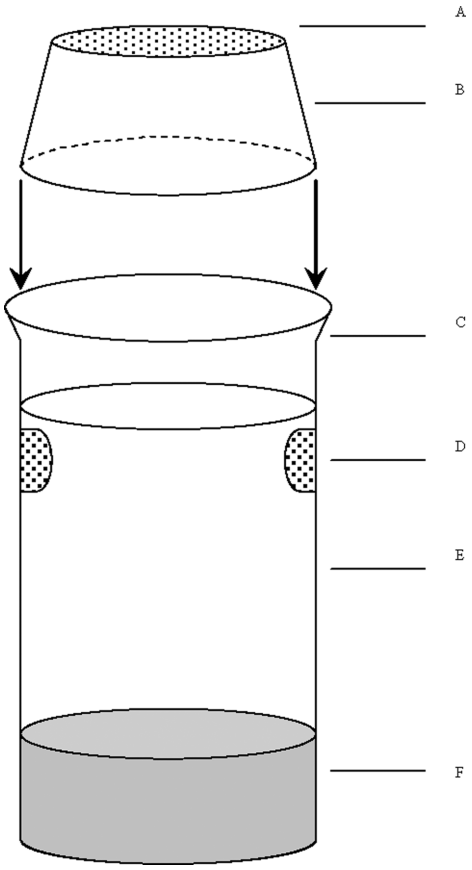
(*) Če se domneva, da bo prišlo do interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno snovjo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto (v takem primeru se torej ne sme uporabiti medij Elendt M4).

▼M4

Dodatek 5

Napotek za spremljanje preobrazbe ličink trzače

Na preskusne čaše se namestijo lovilniki za preobražene osebke. Potrebni so od 20. dne do konca preskusa. Primer lovilnika je narisan spodaj:



A: najlonska mrežica

B: obrnjen plastični lonček

C: poskusna čaša brez ustja

D: mrežasti okenci za izmenjavo vode

E: voda

F: usedlina

▼M4

C.28 PRESKUS STRUPENOSTI S TRZAČAMI V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO VODE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD TG 219 (2004). Zasnovana je za oceno učinkov daljše izpostavljenosti kemikalijam na ličinke sladkovodne trzače *Chironomus* sp., ki živijo v usedlinah. Temelji predvsem na smernici BBA, v kateri je scenarij izpostavljenosti uporaba sistema vode in usedline, sestavljenega iz umetne zemljine in vodnega stolpca (1). Upošteva tudi obstoječe protokole za preskušanje strupenosti za *Chironomus riparius* in *Chironomus tentans*, ki so bili razviti v Evropi in Severni Ameriki (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) ter krožno preskušeni (1) (6) (9). Uporabijo se lahko tudi druge dobro dokumentirane vrste trzače, npr. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Scenarij izpostavljenosti, uporabljen v tej preskusni metodi, je primešanje preskusne snovi v vodo. Izbira ustreznega scenarija izpostavljenosti je odvisna od namena uporabe preskusa. Scenarij izpostavljenosti, ki vključuje primešanje preskusne snovi v vodni stolpec, je namenjen simulaciji pojava zanašanja pesticidov in zajema začetne najvišje koncentracije v porni vodi. Uporaben je tudi za druge vrste izpostavljenosti (vključno z razlitji kemikalij), razen za procese kopičenja, ki trajajo dlje od preskusnega obdobja.

3. Snovi, ki jih je treba preskusiti v zvezi z organizmi, živečimi v usedlinah, se običajno v tem delu zelo dolgo obdržijo. Organizmi, živeči v usedlinah, so lahko izpostavljeni na številne načine. Relativni pomen vsakega načina izpostavljenosti in čas, da ta prispeva k skupnim strupenim učinkom, sta odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti zadevne kemikalije. Pri snoveh, ki se močno adsorbirajo (npr. z log K_{ow} > 5), ali snoveh, ki se kovalentno vežejo na usedlino, je lahko zaužitje kontaminirane hrane pomemben način izpostavljenosti. Da ne bi podcenili strupenosti visoko lipofilnih snovi, se lahko predvidi uporaba hrane, dodane usedlini pred uporabo preskusne snovi. Da bi se upoštevali vsi morebitni načini izpostavljenosti, je ta preskusna metoda osredotočena na dolgoročno izpostavljenost. Preskus za *C. riparius* in *C. yoshimatsui* traja 20 do 28 dni, za *C. tentans* pa 28 do 65 dni. Če so za določen namen potrebni kratkoročni podatki, na primer da se raziščejo učinki nestabilne kemikalije, se lahko dodatne ponovitve umaknejo po 10 dneh.

4. Izmerjene končne točke so skupno število preobraženih odraslih osebkov in čas do preobrazbe. Če so potrebni dodatni kratkoročni podatki, je priporočljivo, da se preživetje in rast ličink izmerita šele po 10-dnevnem obdobju, po potrebi z dodatnimi ponovitvami.

5. Priporoča se uporaba formulirane usedline. Ta ima pred naravnimi usedlinami več prednosti:

   — variabilnost pri poskusih je manjša, saj formulirana usedlina pomeni ponovljivo „standardizirano matrico“, poleg tega ni več treba iskati nekontaminiranih in čistih virov usedlin,

   — preskusi se lahko začnejo kadar koli, ne da bi se bilo treba ukvarjati s sezonsko variabilnostjo v preskusni usedlini, poleg tega usedline ni treba predhodno obdelati, da bi se odstranila domorodna favna; s formulirano usedlino se tudi znižajo stroški, povezani z zbiranjem zadostne količine usedline na terenu za rutinsko preskušanje,

▼M4

— uporaba formulirane usedline omogoča primerjave strupenosti in ustrezno razvrstitev snovi: podatki o strupenosti iz preskusov z naravnimi in umetnimi usedlinami so bili primerljivi za več kemikalij (2).

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

7. Ličinke trzače prvega stadija so izpostavljene razponu koncentracije preskusne kemikalije v sistemih vode in usedline. Preskus se začne z vnosom ličink prvega stadija v preskusne čaše, ki vsebujejo sistem vode in usedline, nato pa se preskusna snov primeša v vodo. Hitrost preobrazbe in razvoja trzač se izmerita ob koncu preskusa. Preživetje in teža ličink se lahko izmerita tudi po 10 dneh, če je to potrebno (z dodatnimi ponovitvami, kot je ustrezno). Ti podatki se analizirajo bodisi z regresijskim modelom, da se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje preobrazbe, preživetja ali rasti ličink (npr. EC_{15}, EC_{50} itd.), bodisi s preskušanjem statističnih domnev za določitev NOEC/LOEC. Slednje zahteva primerjavo vrednosti učinkov s kontrolnimi vrednostmi, za kar se uporabijo statistični preskusi.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

8. Znani morajo biti vodotopnost preskusne snovi, njen parni tlak, izmerjeni ali izračunani koeficient porazdelitve v usedlini ter stabilnost v vodi in usedlini. Za določitev količine preskusne snovi v vodi nad usedlino, porni vodi in usedlini mora biti na voljo zanesljiva analitska metoda z znano in izpričano natančnostjo in mejo zaznave. Med Koristni informaciji sta tudi strukturna formula in čistost preskusne snovi. Prav tako je koristno poznati obnašanje preskusne snovi v okolju (npr. disipacija, abiotska in biotska razgradnja itd.). Dodatne smernice za preskušanje snovi s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, zaradi katerih je preskušanje oteženo, so navedene v (12).

REFERENČNE KEMIKALIJE

9. Redno se lahko preskušajo referenčne kemikalije, da se tako zagotavlja zanesljivost protokola za preskušanje in preskusnih pogojev. Primeri referenčnih strupenih snovi, ki so bile uspešno uporabljene v krožnih preskusih in potrditvenih raziskavah, so: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, kadmijev klorid in kalijev klorid (1) (2) (5) (6) (13).

VELJAVNOST PRESKUSA

10. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— preobrazba v kontrolnih posodah ob koncu preskusa mora biti vsaj 70-odstotna (1) (6),

— *C. riparius* in *C. yoshimatsui* v kontrolnih posodah se morajo v odrasle osebke preobraziti med 12. in 23. dnem po vnosu v posode; *C. tentans* potrebujejo 20 do 65 dni,

— ob koncu preskusa je treba v vsaki posodi izmeriti pH in koncentracijo raztopljenega kisika. Koncentracija kisika mora biti vsaj 60 % nasičenosti zraka (ASV) pri uporabljeni temperaturi, pH vode nad usedlino pa mora biti v vseh preskusnih posodah med 6 in 9,

▼M4

— temperatura vode se ne sme razlikovati za več kot ± 1,0 °C. Temperaturo vode bi bilo mogoče nadzorovati z izotermalnim prostorom; v takem primeru je treba temperaturo v prostoru potrjevati v ustreznih časovnih presledkih.

OPIS METODE

Preskusne posode

11. Raziskava se izvaja v steklenih 600-mililitrskih čašah z 8-centimetrskim premerom. Primerne so tudi druge posode, vendar morajo zagotavljati primerno globino usedline in vode nad njo. Površina usedline mora biti dovolj velika, da zagotavlja 2 do 3 cm^2 na ličinko. Razmerje med debelino usedline in globino vode nad njo mora biti 1 : 4. Preskusne posode in druge naprave, ki bodo prišle v stik s preskusnim sistemom, morajo biti v celoti iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala (npr. teflona).

Izbira vrst

12. Če je mogoče, naj se v preskusu uporabi vrsta *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* je prav tako primerna, vendar je z njo težje delati in zahteva daljše preskusno obdobje. Uporabi se lahko tudi *Chironomus yohimatsui*. Podrobnosti o metodah gojenja za *Chironomus riparius* so navedene v Dodatku 2. Informacije o pogojih gojenja so na voljo tudi za druge vrste, npr. *Chironomus tentans* (4) in *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikacijo vrst je treba potrditi pred preskusom, ni pa to potrebno pred vsakim preskusom, če organizmi prihajajo iz internega gojišča.

Usedlina

13. Če je mogoče, je treba uporabiti formulirano usedlino (imenovano tudi rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina). Če se uporabi naravna usedlina, je treba določiti njene lastnosti (vsaj pH in vsebnost organskega ogljika, priporoča se tudi določitev drugih parametrov, kot sta razmerje C/N in granulometrija), poleg tega ne sme biti onesnažena in ne sme vsebovati drugih organizmov, ki bi lahko tekmovali s trzačami ali jih požrli. Prav tako se priporoča, naj se naravna usedlina pred uporabo v preskusu strupenosti s trzačami 7 dni kondicionira v enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu. Za uporabo v tem preskusu (1) (15) (16) se priporoča naslednja formulirana usedlina, ki temelji na umetni zemljini, uporabljeni v preskusni metodi C.8 (14):

(a) 4–5 % (suhe teže) šote: čim bližje vrednosti pH 5,5 do 6,0; pomembno je uporabiti fino mleto šoto v prahu (velikost delcev ≤ 1 mm), sušeno samo na zraku;

(b) 20 % (suhe teže) kaolinske gline (vsebnost kaolinita po možnosti nad 30 %);

(c) 75–76 % (suhe teže) kremenovega peska (prevladovati mora fini pesek, pri katerem je več kot 50 % delcev velikih 50 do 200 μm);

(d) doda se deionizirana voda, tako da je v končni mešanici vlaga 30- do 50-odstotna;

(e) doda se kemijsko čist kalcijev karbonat ($CaCO_3$), da se pH v končni mešanici usedline uravna na 7,0 ± 0,5;

(f) vsebnost organskega ogljika v končni mešanici mora biti 2 % (± 0,5 %), uravnava pa se z ustreznimi količinami šote in peska v skladu s točkama (a) in (c).

▼M4

14. Vir šote, kaolinske gline in peska mora biti znan. Preveriti je treba, da sestavine usedline niso kemično onesnažene (npr. da ne vsebujejo težkih kovin, organoklornih spojin, organofosfornih spojin itd.). Primer priprave formulirane usedline je opisan v Dodatku 3. Sprejemljiva je tudi mešanica suhih sestavin, če se dokaže, da se sestavine usedline po dodatku vode nad usedlino ne začnejo ločevati (npr. lebdenje šotnih delcev) in da je šota ali usedlina zadostno kondicionirana.

Voda

15. Za preskusno vodo je primerna vsaka voda, ki ustreza kemijskim značilnostim sprejemljive vode za redčenje, ki so navedene v dodatkih 2 in 4. Za gojiščno vodo in preskusno vodo je sprejemljiva vsaka primerna voda, naravna voda (površinska ali podzemna voda), obdelana voda (glej Dodatek 2) ali deklorirana vodovodna voda, če trzače čas gojenja in preskušanja v njej preživijo brez znakov stresa. Na začetku preskusa mora biti pH preskusne vode med 6 in 9, skupna trdota pa ne sme biti višja od 400 mg/l kot $CaCO_3$. Če se domneva, da bo prišlo do interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno snovjo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto (v takem primeru se torej ne sme uporabiti medij Elendt M4). Ves čas raziskave je treba uporabljati isto vrsto vode. Lastnosti vode, navedene v Dodatku 4, je treba izmeriti vsaj dvakrat na leto ali kadar se sumi, da so se morda te lastnosti bistveno spremenile.

Založne raztopine – voda s primešano preskusno snovjo

16. Preskusne koncentracije se izračunajo na podlagi koncentracij v vodnem stolpcu, tj. vodi nad usedlino. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se običajno pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Založne raztopine je po možnosti treba pripraviti tako, da se preskusna snov raztopi v preskusnem mediju. V nekaterih primerih bo morda treba uporabiti topila ali disperzijska sredstva, da se pripravi primerno koncentrirana osnovna raztopina. Primerna topila so na primer aceteon, etanol, metanol, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetil formamid in trietilen glikol. Disperzijska sredstva, ki se lahko uporabijo, so Cremaphor RH40, Tween 80, metil celuloza 0,01 % in HCO-40. Koncentracija topila v končnem preskusnem mediju mora biti minimalna (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) in mora biti enaka v vseh posodah s preskusno snovjo. Kadar se uporabi topilo, to ne sme bistveno vplivati na preživetje ličink trzače ali imeti vidnih škodljivih učinkov nanje, kar se pokaže s kontrolno enoto, v kateri je le topilo. Vendar si je treba čim bolj prizadevati, da se taki materiali ne uporabijo.

NAČRT PRESKUSA

17. Načrt preskusa se nanaša na izbiro števila preskusnih koncentracij in razmikov med njimi, število posod za vsako koncentracijo in število ličink na posodo. Opisani so načrti za točkovno oceno EC, oceno NOEC in izvedbo mejnega preskusa. Regresijska analiza je primernejša od pristopa s preskušanjem domnev.

Načrt preskusa za regresijsko analizo

18. S koncentracijami, vključenimi v preskus, bi morala biti zajeta efektivna koncentracija (npr. EC_{15}, EC_{50}) in razpon koncentracije, v katerem je zanimiv vpliv preskusne snovi. Na splošno se natančnost in zlasti veljavnost, ki ju je mogoče doseči pri ocenah efektivnih koncentracij (EC_x), izboljšata, kadar je efektivna koncentracija v okviru preskušanega razpona koncentracij.

▼M4

Izogibati se je treba ekstrapolaciji veliko pod najnižjo pozitivno koncentracijo ali veliko nad najvišjo koncentracijo. Kot pomoč pri izbiri razpona koncentracij, ki bo uporabljen (glej odstavek 27), se lahko izvede predhodni preskus za ugotavljanje razpona.

19. Če je treba oceniti EC_x, je treba preskusiti vsaj 5 koncentracij in izvesti 3 ponovitve za vsako koncentracijo. Vsekakor je priporočljivo uporabiti dovolj preskusnih koncentracij, da se omogoči dobra ocena modela. Faktor med koncentracijami ne sme biti večji od 2 (izjema je dopustna, kadar naklon krivulje odmerek-učinek ni strm). Število ponovitev na posamezno posodo s preskusno snovjo se lahko zmanjša, če se poveča število preskusnih koncentracij z različnimi učinki. Povečanje števila ponovitev ali zmanjšanje velikosti razmikov med preskusnimi koncentracijami običajno vodi do ožjih intervalov zaupanja za preskus. Dodatne ponovitve so potrebne, če se ocenjujeta 10-dnevno preživetje in rast ličink.

Načrt za oceno NOEC/LOEC

20. Če je treba oceniti LOEC/NOEC, bi bilo treba uporabiti pet preskusnih koncentracij in izvesti vsaj štiri ponovitve, faktor med koncentracijami pa ne sme biti večji od 2. Število ponovitev mora zadostovati, da se zagotovi ustrezna statistična vrednost za ugotovitev 20-odstotne razlike v primerjavi s kontrolno enoto pri 5-odstotni stopnji značilnosti ($p = 0,05$). Pri hitrosti razvoja je običajno ustrezna analiza variance (ANOVA), kot sta Dunnettov preskus in Williamsov preskus (17) (18) (19) (20). Pri koeficientu preobrazbe se lahko uporabijo Cochran-Armitageev preskus, Fisherjev eksaktni preskus (z Bonferronijevim popravkom) ali Mantel-Haenszelov preskus.

Mejni preskus

21. Če v predhodnem preskusu za ugotavljanje razpona ni bilo opaženih učinkov, se lahko opravi mejni preskus (ena preskusna koncentracija in kontrolna enota). Namen mejnega preskusa je pokazati, da je toksična vrednost preskusne snovi večja od preskušene mejne koncentracije. Pri tej preskusni metodi priporočene koncentracije ni mogoče predlagati; to je prepuščeno presoji regulatorjev. Običajno je potrebnih vsaj šest ponovitev za preskusne in kontrolne posode. Izkazati je treba ustrezno statistično vrednost za ugotovitev 20-odstotne razlike v primerjavi s kontrolno enoto pri 5-odstotni stopnji značilnosti ($p = 0,05$). Kar zadeva učinek na hitrost razvoja in težo, je t-preskus primerna statistična metoda, če podatki izpolnjujejo zahteve tega preskusa (normalnost, homogenost varianc). Če te zahteve niso izpolnjene, se lahko uporabi t-preskus za neenake variance ali neparametrični preskus, kot je Wilcoxon-Mann-Whitneyjev preskus. Pri koeficientu preobrazbe je primeren Fisherjev eksaktni preskus.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Priprava sistema vode in usedline, v katerem je preskusna snov primešana v vodo

22. V preskusne posode se dodajo ustrezne količine formulirane usedline (glej odstavka 13 in 14 ter Dodatek 3), da nastane plast, debela vsaj 1,5 cm. Doda se voda do globine 6 cm (glej odstavek 15). Razmerje med debelino usedline in globino vode ne sme biti večje od 1 : 4, usedlina pa ne sme biti debelejša od 3 cm. Sistem vode in usedline je treba sedem dni rahlo prezračevati, preden se dodajo preskusni organizmi (glej odstavek 14 in Dodatek 3). Da se prepreči ločevanje sestavin usedline in ponovna suspenzija finega materiala med dodajanjem preskusne vode v vodni stolpec, se lahko usedlina med točenjem vode prekrije s plastičnim pokrovom, ki se takoj nato odstrani. Primerna so lahko tudi druga sredstva.

▼M4

23. Preskusne posode je treba pokriti (npr. s steklenimi ploščami). Po potrebi se med raziskavo voda dotoči do prvotne količine, da se nadomesti izhlapela voda. Za to je treba uporabiti destilirano ali deionizirano vodo, da se prepreči kopičenje soli.

Dodajanje preskusnih organizmov

24. Od 4 do 5 dni pred vnosom preskusnih organizmov v preskusne posode je treba iz gojišč vzeti jajčna legla in jih vstaviti v majhne posode v gojitvenem mediju. Uporabi se lahko starejši medij iz osnovne kulture ali sveže pripravljeni medij. Če se uporabi slednji, je treba v gojitveni medij dodati majhno količino hrane, npr. zelenih alg in/ali nekaj kapljic filtrata suspenzije iz fino mlete ribje hrane v kosmičih (glej Dodatek 2). Uporabiti je treba samo sveže odložena jajčna legla. Običajno se ličinke izležejo nekaj dni po tem, ko so bila jajčeca odložena (2 do 3 dni za *Chironomus riparius* pri 20 °C ter 1 do 4 dni za *Chironomus tentans* pri 23 °C in *Chironomus yoshimatsui* pri 25 °C), rast ličink pa poteka v 4 stadijih, od katerih vsak traja 4 do 8 dni. V preskusu je treba uporabiti ličinke prvega stadija (2 do 3 ali 1 do 4 dni po tem, ko se izležejo). Stadij trzač se lahko po možnosti preveri z merjenjem širine glave (6).

25. 20 ličink prvega stadija se s topo pipeto naključno vnese v vsako preskusno posodo, ki vsebuje usedlino in vodo s primešano preskusno snovjo. Med dodajanjem ličink v preskusne posode je treba ustaviti prezračevanje vode, ki se ne sme izvajati še 24 ur po tem, ko so bile ličinke dodane (glej odstavka 24 in 32). Glede na uporabljeni načrt preskusa (glej odstavka 19 in 20) se za točkovno oceno EC uporabi vsaj 60 ličink na koncentracijo, za določitev NOEC pa 80.

26. 24 ur po vnosu ličink se preskusna snov vmeša v vodni stolpec nad usedlino, znova se zagotovi prezračevanje. Pod površino vodnega stolpca se s pipeto vnesejo majhne količine raztopine preskusne snovi. Vodo nad usedlino je nato treba premešati, pri čemer je treba paziti, da se ne premeša še usedlina.

Preskusne koncentracije

27. Preskus za ugotavljanje razpona je lahko koristen za določitev razpona koncentracij za končni preskus. Za ta namen se uporabi niz široko razmaknjenih koncentracij preskusne snovi. Da se zagotovi enaka gostota površine na trzačo, kot bo uporabljena za končni preskus, se trzače izpostavijo vsaki koncentraciji preskusne snovi za obdobje, ki omogoča oceno ustreznih preskusnih koncentracij, pri čemer ponovitve niso potrebne.

28. Preskusne koncentracije za končni preskus se določijo na podlagi rezultata preskusa za ugotavljanje razpona. Izbrati in uporabiti je treba vsaj pet koncentracij, kot je opisano v odstavkih 18 do 20.

Kontrolne enote

29. V preskus je treba vključiti kontrolne posode, v katerih ni preskusne snovi, toda ki vsebujejo usedlino, z ustreznim številom ponovitev (glej odstavka 19 in 20). Če je bilo za aplikacijo preskusne snovi uporabljeno topilo (glej odstavek 16), je treba dodati kontrolno posodo, katere usedlina vsebuje tudi topilo.

▼M4

Preskusni sistem

30. Uporabljajo se statični sistemi. Polstatični ali pretočni sistemi z občasnim ali kontinuiranim obnavljanjem vode nad usedlino se lahko uporabijo v izjemnih primerih, na primer če specifikacije kakovosti vode postanejo neprimerne za preskusni organizem ali vplivajo na kemijsko ravnotežje (npr. ravni raztopljenega kisika se preveč znižajo, koncentracija izločkov se preveč poviša ali minerali iztekajo iz usedline in vplivajo na pH in/ali trdoto vode). Vendar za izboljšanje kakovosti vode nad usedlino običajno zadoščajo in se prednostno uporabljajo druge metode, kot je prezračevanje.

Hrana

31. Ličinke je treba hraniti, po možnosti vsak dan ali vsaj trikrat na teden. Za mlade ličinke v prvih desetih dneh ustreza 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg za *C. yoshimatsui*) ribje hrane (suspenzija v vodi ali fino mleta hrana, npr. TetraMin ali TetraPhyll; glej podrobnosti v Dodatku 2) na ličinko na dan. Nekoliko več hrane bodo morda potrebovale starejše ličinke: za preostanek preskusa mora zadostovati 0,5–1 mg na ličinko na dan. Obrok hrane je treba zmanjšati v vseh preskusnih in kontrolnih posodah, če se opazi rast glivic ali smrtnost v kontrolnih posodah. Če razvoja glivic ni mogoče ustaviti, je treba preskus ponoviti. Kadar se preskušajo snovi, ki se močno adsorbirajo (npr. z log K_{ow} > 5), ali snovi, ki se kovalentno vežejo na usedlino, se lahko količina hrane, potrebna za zagotovitev preživetja in naravne rasti organizmov, doda formulirani usedlini pred obdobjem stabilizacije. Za to je treba namesto ribje hrane uporabiti rastlinski material, npr. dodatek 0,5 % (suhe teže) fino mletih listov npr. velike koprive (*Urtica dioica*), bele murve (*Morus alba*), plazeče detelje (*Trifolium repens*), špinače (*Spinacia oleracea*) ali drugega rastlinskega materiala (*Cerophyl* ali alfa celuloza).

Pogoji inkubacije

32. Zagotovi se rahlo prezračevanje vode nad usedlino v preskusnih posodah, po možnosti 24 ur po vnosu ličink, in se izvaja ves čas preskusa (paziti je treba, da koncentracija raztopljenega kisika ne pade pod 60 % ASV). Prezračevanje se zagotavlja prek steklene pasteurjeve pipete, pritrjene 2 do 3 cm nad plastjo usedline (tj. 1 ali nekaj mehurčkov/s). Kadar se preskušajo hlapne kemikalije, je mogoče razmisliti o tem, da se sistem vode in usedline ne bi prezračeval.

33. Preskus se izvaja pri konstantni temperaturi 20 °C (± 2 °C). Za *C. tentans* in *C. yoshimatsui* sta priporočeni temperaturi 23 °C oziroma 25 °C (± 2 °C). Uporablja se 16-urno obdobje osvetljenosti, jakost svetlobe pa mora biti 500 do 1 000 lux.

Trajanje izpostavljenosti

34. Izpostavljenost se začne z vnosom ličink v posode s primešano preskusno snovjo in kontrolne posode. Najdaljši čas izpostavljenosti za *C. riparius* in *C. yoshimatsui* je 28 dni, za *C. tentans* pa 65 dni. Če se ličinke v odrasle osebke preobrazijo prej, se lahko preskus konča najmanj pet dni po preobrazbi zadnjega odraslega osebka v kontrolni posodi.

OPAŽANJA

Preobrazba

35. Določita se čas razvoja in skupno število v celoti preobraženih samcev in samic trzače. Samce je mogoče preprosto prepoznati po pahljačastih tipalkah.

▼M4

36. Preskusne posode je treba opazovati vsaj trikrat na teden, da se ugotovi kakršno koli neobičajno obnašanje (npr. zapuščanje usedline, nenavadno plavanje) v primerjavi s kontrolno posodo. V obdobju pričakovane preobrazbe je potrebno dnevno štetje preobraženih trzač. Spol in število v celoti preobraženih trzač se zapišeta dnevno. Po identifikaciji se trzače odstranijo iz posod. Vsa jajčna legla, odložena pred zaključkom preskusa, je treba evidentirati in nato odstraniti, da se prepreči vnovični vnos ličink v usedlino. Evidentira se tudi število vidnih bub, ki se niso preobrazile. Napotek za spremljanje preobrazbe je v Dodatku 5.

Rast in preživetje

37. Če je treba zagotoviti podatke o 10-dnevnem preživetju in rasti ličink, je treba na začetku vključiti dodatne preskusne posode, ki se lahko uporabijo pozneje. Usedlina iz teh dodatnih posod se preseje skozi sito z 250 μm velikimi luknjicami, da se zadržijo ličinke. Merili za pogin sta negibnost ali neodzivnost na mehanske dražljaje. Ličinke, ki ostanejo v usedlini, je prav tako treba šteti za mrtve (ličinke, ki so poginile na začetku preskusa, so morda razgradili mikrobi). Določi se suha teža (brez pepela) preživelih ličink na preskusno posodo in izračuna srednja suha teža posamezne ličinke na posodo. Koristno je določiti, v kateri stadij spadajo preživele ličinke; za to se lahko izmeri širina glave vsakega osebka.

Analitske meritve

Koncentracija preskusne snovi

38. Na začetku (po možnosti 1 uro po vnosu preskusne snovi) in koncu preskusa je treba analizirati vsaj vzorce vode nad usedlino, porne vode in usedline, in sicer pri najvišji in nižji koncentraciji. Te določitve koncentracije preskusne snovi pokažejo obnašanje/porazdelitev preskusne snovi v sistemu vode in usedline. Vzorčenje usedline na začetku preskusa lahko vpliva na preskusni sistem (npr. odstranitev preskusnih ličink), zato je treba za analitske določitve na začetku preskusa in med njim po potrebi uporabiti dodatne preskusne posode (glej odstavek 39). Meritve v usedlini morda ne bodo potrebne, če je bila porazdelitev preskusne snovi med vodo in usedlino jasno določena z raziskavo vode/usedline v primerljivih pogojih (npr. razmerje usedline in vode, vrsta uporabe, vsebnost organskega ogljika v usedlini).

39. Kadar se izvajajo vmesne meritve (npr. sedmi dan) in če so za analize potrebni veliki vzorci, ki jih ni mogoče vzeti iz preskusnih posod, ne da bi to vplivalo na preskusni sistem, je treba analitske določitve izvesti na vzorcih iz dodatnih preskusnih posod, ki se obdelujejo enako (vključno s prisotnostjo preskusnih organizmov), vendar se za biološka opažanja ne uporabljajo.

40. Za izolacijo intersticijske vode se priporoča 30-minutno centrifugiranje pri npr. 10 000 g in 4 °C. Če pa se za preskusno snov izkaže, da se ne adsorbira na filtre, je sprejemljivo tudi filtriranje. V nekaterih primerih morda koncentracij v porni vodi zaradi premajhnega vzorca ne bo mogoče analizirati.

▼M4

Fizikalno-kemijski parametri

41. Vrednost pH, raztopljeni kisik v preskusni vodi in temperaturo preskusnih posod je treba ustrezno meriti (glej odstavek 10). Trdoto in amonij je treba izmeriti v kontrolnih posodah in eni preskusni posodi pri najvišji koncentraciji na začetku in koncu preskusa.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

42. Namen tega preskusa je določiti učinek preskusne snovi na hitrost razvoja in skupno število v celoti preobraženih samcev in samic trzače oziroma, pri 10-dnevnem preskusu, učinke na preživetje in težo ličink. Če ni znakov o statistično različni občutljivosti spolov, se lahko rezultati za samce in samice za statistične analize združijo. Razlike v občutljivosti med spoloma je mogoče statistično oceniti, na primer s preskusom χ^2-r × 2. Po potrebi je treba po 10 dneh določiti preživetje ličink in srednjo suho težo posamezne ličinke na posodo.

43. Če je mogoče, se efektivne koncentracije, izražene kot koncentracije v vodi nad usedlino, izračunajo na podlagi izmerjenih koncentracij na začetku preskusa (glej odstavek 38).

44. Za točkovno oceno EC_{50} ali druge EC_x se lahko statistični podatki po posameznih posodah uporabijo kot dejanske ponovitve. Pri izračunu intervala zaupanja za EC_x je treba upoštevati variabilnost med posodami ali pa dokazati, da je ta zanemarljiva. Če se model prilega po metodi najmanjših kvadratov, je treba statistične podatke po posameznih posodah transformirati, da se izboljša homogenost variance. Vendar je treba vrednosti EC_x izračunati po tem, ko so bili rezultati transformirani nazaj na prvotno vrednost.

45. Kadar je namen statistične analize določiti NOEC/LOEC s preskušanjem domnev, je treba upoštevati variabilnost med posodami, npr. z vgnezdeno ANOVO. Alternativno se lahko uporabijo robustnejši preskusi (21), kadar so običajne predpostavke ANOVE kršene.

Koeficient preobrazbe

46. Koeficient preobrazbe da odgovor „vse ali nič“ in se lahko analizira s Cochran-Armitageevim preskusom, uporabljenim regresivno (step-down), kadar se pričakuje monotono razmerje odmerek-učinek in so ti podatki v skladu s tem pričakovanjem. Če niso, se lahko uporabi Fisherjev eksaktni preskus ali Mantel-Haenszelov preskus z Bonferroni-Holmovimi popravljenimi p-vrednostmi. Če se izkaže, da je variabilnost med ponovitvami v okviru iste koncentracije večja, kot bi kazala binomska porazdelitev (pogosto imenovana „ekstra-binomska“ variacija), potem je treba uporabiti robustni Cochran-Armitageev preskus ali Fisherjev eksaktni preskus, kot je predlagano v (21).

47. Vsota preobraženih trzač na posodo ne se določi in deli s številom vnesenih ličink na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

pri čemer je:

ER = koeficient preobrazbe,

n_e = število preobraženih trzač na posodo,

n_a = število vnesenih ličink na posodo.

48. Druga možnost, ki je najprimernejša za velike vzorce, kadar obstaja ekstra binomska varianca, je, da se koeficient preobrazbe obravnava kot zvezni odgovor in se uporabijo postopki, kot je Williamsov preskus, kadar se pričakuje monotono razmerje odmerek-učinek in kadar podatki ER potrjujejo to predpostavko. Dunettov preskus je primeren, kadar monotonost ne drži. Velik vzorec je tu opredeljen kot število preobraženih osebkov in število nepreobraženih osebkov po posameznih ponovitvah (posodah), pri čemer je obojih več kot pet.

49. Za uporabo metod ANOVA je treba vrednosti ER najprej transformirati z arkus sinus-korensko transformacijo ali Freeman-Tukeyevo transformacijo, da se dobi približna normalna porazdelitev in da se variance izenačijo. Cochran-Armitageev preskus, Fisherjev eksaktni preskus (Bonferroni) ali Mantel-Haenszelov preskus se lahko uporabijo, kadar se uporabljajo absolutne pogostosti. Pri arkus sinus-korenski transformaciji se izračuna arkus sinus ($\sin^{-1}$) kvadratnega korena ER.

50. Za koeficiente preobrazbe se vrednosti EC_x izračunajo z regresijsko analizo (ali npr. probit (22), logit, Weibull, ustrezno programsko opremo itd.). Če regresijska analiza ni uspešna (npr. kadar sta manj kot dva delna odgovora), se uporabijo druge neparametrične metode, kot sta drseče povprečje ali linearna interpolacija.

Hitrost razvoja

51. Srednji čas razvoja pomeni srednji časovni razpon med vnosom ličink (dan 0 preskusa) in preobrazbo poskusne kohorte trzač. (Za izračun dejanskega časa razvoja je treba upoštevati starost ličink ob vnosu.) Hitrost razvoja je obratna času razvoja (enota: 1/dan) in predstavlja tisti delež razvoja ličink, ki se zgodi na dan. Za oceno teh raziskav strupenosti v usedlini je primernejša hitrost razvoja, saj je njena varianca manjša, poleg tega je bolj homogena in bližje normalni porazdelitvi v primerjavi s časom razvoja. Zato so učinkoviti parametrični preskusi primernejši za hitrost razvoja kot za čas razvoja. Če se hitrost razvoja obravnava kot zvezni odgovor, se lahko vrednosti EC_x ocenijo z regresijsko analizo (npr. (23) (24)).

52. Za naslednje statistične preskuse se za število trzač, opaženih na dan opazovanja x, domneva, da so se preobrazile na sredini časovnega intervala med dnevom × in dnevom x – 1 (l = dolžina intervala opazovanja, običajno 1 dan). Srednja hitrost razvoja na posodo (x) se izračuna z enačbo:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

pri čemer je:

$\bar{x}$: srednja hitrost razvoja na posodo,

i: indeks intervala opazovanja,

m: največje število intervalov opazovanja,

▼M4

f_i: število trzač, preobraženih v intervalu opazovanja i,

n_e: skupno število preobraženih trzač ob koncu poskusa, (= $\sum f_i$)

x: hitrost razvoja trzač, preobraženih v intervalu i.

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

pri čemer je:

day_i: dan opazovanja (dnevi od vnosa),

l_i: dolžina intervala opazovanja i (dnevi, običajno 1 dan).

Poročilo o preskusu

53. V poročilu o preskusu morajo biti vsaj naslednje informacije:

Preskusna snov:

— fizikalno stanje, in kjer je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (vodotopnost, parni tlak, porazdelitveni koeficient v tleh (ali v usedlini, če je na voljo), stabilnost v vodi itd.),

— kemijski identifikacijski podatki (splošno ime, kemijsko ime, strukturna formula, številka CAS itd.), vključno s čistostjo in analitsko metodo za količinsko določanje preskusne snovi.

Preskusne vrste:

— uporabljene preskusne živali: vrsta, znanstveno ime, vir organizmov in pogoji razmnoževanja,

— informacije o ravnanju z jajčnimi legli in ličinkami,

— starost preskusnih živali ob vnosu v preskusne posode.

Preskusni pogoji:

— uporabljena usedlina, tj. naravna ali formulirana,

— za naravno usedlino lokacija in opis mesta vzorčenja usedline, vključno, če je mogoče, s preteklim onesnaženjem, značilnosti: pH, vsebnost organskega ogljika, razmerje C/N in granulometrija (če je ustrezno),

— priprava formulirane usedline: sestavine in značilnosti (vsebnost organskega ogljika, pH, vlaga itd. na začetku preskusa),

— priprava preskusne vode (če se uporablja obdelana voda) in značilnosti (koncentracija kisika, pH, prevodnost, trdota itd. na začetku preskusa),

— globina usedline in vode nad njo,

— količina vode nad usedlino in porne vode; teža mokre usedline s porno vodo in brez nje,

— preskusne posode (material in velikost),

— način priprave osnovnih raztopin in preskusnih koncentracij,

▼M4

— uporaba preskusne snovi: uporabljene preskusne koncentracije, število ponovitev in uporaba topila, če je bilo uporabljeno,

— pogoji inkubacije: temperatura, svetlobni ciklus in jakost svetlobe, prezračevanje (pogostost in jakost),

— podrobne informacije o hranjenju, vključno z vrsto hrane, pripravo, količino in načinom.

Rezultati:

— nazivne preskusne koncentracije, izmerjene preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določitev koncentracije preskusne snovi v preskusni posodi,

— kakovost vode v preskusnih posodah, tj. pH, temperatura, raztopljeni kisik, trdota in amonij,

— morebitna nadomestitev izhlapele preskusne vode,

— število preobraženih samcev in samic trzače na posodo in na dan,

— število ličink, ki se niso preobrazile v trzače, na posodo,

— srednja suha teža posamezne ličinke na posodo in po stadijih, če je ustrezno,

— delež preobrazbe na ponovitev in preskusno koncentracijo (združeni samci in samice trzače),

— srednja hitrost razvoja v celoti preobraženih trzač na ponovitev in stopnjo koncentracije (združeni samci in samice trzače),

— ocene strupenih končnih točk, npr. ECx (in s tem povezani intervali zaupanja), NOEC in/ali LOEC, ter statistične metode, uporabljene za njihovo določitev,

— obravnava rezultatov, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izvirajo iz odstopanj od te preskusne metode.

VIRI:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Uredila M. Streloke in H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming, R., idr. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Končno poročilo za Evropsko komisijo. Poročilo št.: EC 3738. Avgust 1994. WRc, Združeno kraljestvo.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Z delavnice WOSTA, ki je potekala na Nizozemskem.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. V ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Zvezek 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Druga izdaja. EPA 600/R-99/064. Marec 2000. Sprememba prve izdaje iz junija 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani, D., Day, K. E., McLeay, D. J., Kirby, R. S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

(11) Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Poglavje C.8 te priloge, Strupenost za deževnike.

(15) Suedel, B. C., in Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

(16) Naylor, C., in Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(17) Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

(19) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

(20) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

(21) Rao, J. N. K., in Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

(22) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

(23) Bruce in Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

(24) Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Za to metodo se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

formulirana usedlina ali rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina je zmes snovi, uporabljenih za posnemanje fizičnih sestavin naravne usedline;

voda nad usedlino je voda, ki se nalije nad usedlino v preskusni posodi;

intersticijska voda ali porna voda je voda, ki zavzema prostor med delci usedline in zemljine;

voda s primešano snovjo je preskusna voda, ki ji je bila dodana preskusna snov;

preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

Dodatek 2

Priporočila za gojenje *Chironomus riparius*

1. Ličinke *Chironomus* se lahko gojijo v kristalizirkah ali večjih vsebnikih. Na dno vsebnika se nanese tanka plast finega kremenovega peska (debela približno 5 do 10 mm). Za primeren substrat se je izkazal tudi kieselguhr (npr. Merck, Art 8117) (zadošča tanjša plast, debela samo nekaj mm). Nato se doda primerna voda do globine več cm. Vodo je treba po potrebi dotočiti, da se nadomestijo izgube zaradi izhlapevanja in prepreči izsušitev. Voda se po potrebi lahko zamenja. Zagotoviti je treba rahlo prezračevanje. Posode, v katerih se gojijo ličinke, morajo biti v primerni kletki, ki bo preprečila pobeg odraslih preobraženih osebkov. Kletka mora biti dovolj velika, da lahko preobraženi odrasli osebki rojijo, sicer se lahko zgodi, da ne bo parjenja (najmanjša velikost je približno 30 × 30 × 30 cm).

2. Kletke morajo biti v prostoru s sobno temperaturo ali prostoru s stalnim ozračjem pri 20 ± 2 °C s 16-urnim obdobjem svetlobe (jakost približno 1 000 lux) in 8-urno temo. Po poročilih lahko manj kot 60-odstotna relativna vlažnost zraka ovira razmnoževanje.

Voda za redčenje

3. Uporabi se lahko vsaka primerna naravna ali sintetična voda. Običajno se uporabljajo voda iz vodnjaka, deklorirana vodovodna voda in umetni mediji (npr. medij Elendt „M4“ ali „M7“, glej spodaj). Vodo je treba pred uporabo prezračiti. Voda za gojenje se lahko po potrebi obnovi, tako da se uporabljena voda iz gojitvenih posod skrbno pretoči ali izsesa, ne da bi pri tem uničili ovoj ličink.

Hranjenje ličink

4. Ličinke *Chironomus* je treba hraniti s približno 250 mg ribje hrane v kosmičih (TetraMin®, TetraPhyll® ali druga podobna zaščitena znamka ribje hrane) na posodo na dan. Hrana se lahko daje v obliki suhega mletega prahu ali kot suspenzija v vodi: 1,0 g hrane v kosmičih se doda 20 ml vode za redčenje in zmeša, da nastane homogena mešanica. Ta pripravek se lahko daje v količini približno 5 ml na posodo na dan (pred uporabo ga je treba pretresti). Starejše ličinke lahko dobijo več hrane.

5. Hranjenje se prilagaja kakovosti vode. Če gojitveni medij postane „moten“, je treba hranjenje zmanjšati. Dodajanje hrane je treba skrbno spremljati. Premalo hrane bo povzročilo selitev ličink v vodni stolpec, preveč hrane pa povečano mikrobno dejavnost in zmanjšane koncentracije kisika. Oboje lahko privede do počasnejše rasti.

6. Ko se pripravijo nove gojitvene posode, se lahko dodajo tudi celice nekaterih zelenih alg (npr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris)*.

Hranjenje preobraženih odraslih osebkov

7. Nekateri raziskovalci so predlagali, da se lahko kot hrana za odrasle preobražene osebke uporabi vatna blazinica, namočena v nasičeno raztopino saharoze.

▼M4

Preobrazba

8. Pri 20 ± 2 °C se bo preobrazba v odrasle osebke iz posod za gojenje ličink začela po približno 13 do 15 dneh. Samce je mogoče preprosto prepoznati po pahljačastih tipalkah.

Jajčna legla

9. Ko so v kletki za razmnoževanje odrasli osebki, je treba vse posode za gojenje ličink trikrat tedensko preveriti zaradi morebitnih odloženih želatinastih jajčnih legel, ki jih je treba previdno odstraniti. Prenesti jih je treba v majhno posodo, ki vsebuje vzorec vode za razmnoževanje. Jajčna legla se uporabijo za pripravo nove gojitvene posode (npr. 2 do 4 jajčna legla/posodo) ali za preskuse strupenosti.

10. Ličinke prvega stadija bi se morale izleči po 2 ali 3 dneh.

Priprava novih gojitvenih posod

11. Ko so gojišča vzpostavljena, bi moralo biti mogoče novo gojitveno posodo za ličinke pripraviti vsak teden ali manj pogosto, odvisno od zahtev preskušanja, stare posode pa odstraniti, ko se ličinke preobrazijo v odrasle osebke. S takim sistemom bo najpreprosteje zagotovljena redna oskrba z odraslimi osebki.

Priprava preskusnih raztopin „M4“ in „M7“

12. Elendt (1990) je opisal medij „M4“. Medij „M7“ se pripravi kot medij „M4“, razen za snovi, navedene v preglednici 1, za katere so koncentracije pri „M7“ štirikrat nižje kot pri „M4“. Publikacija o mediju „M7“ je v pripravi (Elendt, osebno sporočilo). Preskusna raztopina se ne sme pripraviti po Elendt in Bias (1990), saj koncentracije $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 in K_2HPO_4, navedene za pripravo osnovnih raztopin, niso ustrezne.

Priprava medija „M7“

13. Vsaka osnovna raztopina (I) se pripravi posebej, sestavljena osnovna raztopina (II) pa se pripravi iz teh osnovnih raztopin (I) (glej preglednico 1). V 50 ml sestavljene osnovne raztopine (II), ki ji je dodana količina vsake osnovne raztopine makrohranilnih snovi, navedena v preglednici 2, se dolije do 1 litra deionizirana voda, da se pripravi medij „M7“. Založna raztopina vitaminov se pripravi tako, da se trije vitamini dodajo v deionizirano vodo, kot je navedeno v preglednici 3, 0,1 ml sestavljene osnovne raztopine vitaminov pa se doda končnemu mediju „M7“ malo pred uporabo. (Založna raztopina vitaminov se shranjuje zamrznjena v majhnih alikvotih.) Medij se prezračuje in stabilizira.

Preglednica 1

Založne raztopine elementov v sledeh za medija M4 in M7

Založne raztopine (I)	Količina (mg) za pripravo 1 litra z deionizirano vodo	Za pripravo sestavljene osnovne raztopine (II): zmešajte naslednje količine (ml) osnovnih raztopin (I) in dopolnite do 1 litra z deionizirano vodo		Končne koncentracije v preskusnih raztopinah (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Založne raztopine (I)	Količina (mg) za pripravo 1 litra z deionizirano vodo	Za pripravo sestavljene osnovne raztopine (II): zmešajte naslednje količine (ml) osnovnih raztopin (I) in dopolnite do 1 litra z deionizirano vodo		Končne koncentracije v preskusnih raztopinah (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Te snovi se pri M4 in M7 razlikujejo, kot je navedeno zgoraj.
(2) Te raztopine se pripravijo posamezno, nato zlijejo skupaj in takoj avtoklavirajo.

Preglednica 2

Založne raztopine makrohranilnih snovi za medija M4 in M7

	Količina za pripravo 1 litra z deionizirano vodo (mg)	Količina osnovnih raztopin makrohranilnih snovi za pripravo medijev M4 in M7 (ml/l)	Končne koncentracije v preskusnih raztopinah M4 in M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Preglednica 3

Založna raztopina vitaminov za medija M4 in M7

Vse tri raztopine vitaminov so združene v eno.

	Količina za pripravo 1 litra z deionizirano vodo (mg)	Količina dodane osnovne raztopine vitaminov za pripravo medijev M4 in M7 (ml/l)	Končne koncentracije v preskusnih raztopinah M4 in M7 (mg/l)
Tiamin hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

VIRI:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Uredila M. Streloke in H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt, B. P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B. P., in Bias, W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Dodatek 3

PRIPRAVA FORMULIRANE USEDLINE

Sestava usedline

Sestava formulirane usedline mora biti naslednja:

Sestavina	Značilnosti	Delež suhe teže usedline v %
Šota	Šotni mah, čim bližje pH 5,5 do 6,0, brez vidnih ostankov rastlin, fino mlet (velikost delcev ≤ 1 mm) in sušen na zraku.	4–5
Kremenov pesek	Velikost zrn: > 50 % delcev mora biti velikih 50–200 μm.	75–76
Kaolinska glina	Vsebnost kaolinita ≥ 30 %.	20
Organski ogljik	Uravnava se z dodatkom šote in peska.	2 (± 0,5)
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$, zdrobljen v prah, kemijsko čist.	0,05–0,1
Voda	Prevodnost ≤ 10 μS/cm.	30–50

Priprava

Šota se posuši na zraku in zmelje v fin prah. Pripravi se suspenzija potrebne količine šote v prahu v deionizirani vodi, za kar se uporabi visoko zmogljiva naprava za homogenizacijo. pH te suspenzije se s $CaCO_3$ uravna na 5,5 ± 0,5. Suspenzija se vsaj 2 dneva kondicionira z rahlim mešanjem pri 20 ± 2 °C, da se stabilizira pH in vzpostavi stabilna mikrobna komponenta. Vrednost pH se znova izmeri in mora biti 6,0 ± 0,5. Šotna suspenzija se nato zmeša z drugimi sestavinami (peskom in kaolinsko glino) in deionizirano vodo, da nastane homogena usedlina z vsebnostjo vode v razponu 30 do 50 % suhe teže usedline. pH končne mešanice se znova izmeri in po potrebi uravna na 6,5 do 7,5 s $CaCO_3$. Vzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in vsebnost organskega ogljika. Priporoča se, da se formulirana usedlina pred uporabo v preskusu strupenosti s trzačami 7 dni kondicionira v enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu.

Shranjevanje

Suhe sestavine za pripravo umetne usedline se lahko shranjujejo v suhem in hladnem prostoru pri sobni temperaturi. Formulirana (mokra) usedlina se pred uporabo v preskusu ne sme shranjevati. Uporabiti jo je treba takoj po 7-dnevnem obdobju kondicioniranja, s katerim se njena priprava konča.

VIRI:

Poglavje C.8 te priloge. Strupenost za deževnike.

Meller, M., Egeler, P., Rombke, J., Schallnass, H., Nagel, R., Streit, B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Dodatek 4

Kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje

Snov	Koncentracije
Delci	< 20 mg/l
Celotni organski ogljik	< 2 mg/l
Neionizirani amoniak	< 1 μg /l
Trdota kot $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Ostanek klora	< 10 μg /l
Skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/1
Skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/1
Skupni organski klor	< 25 ng/1

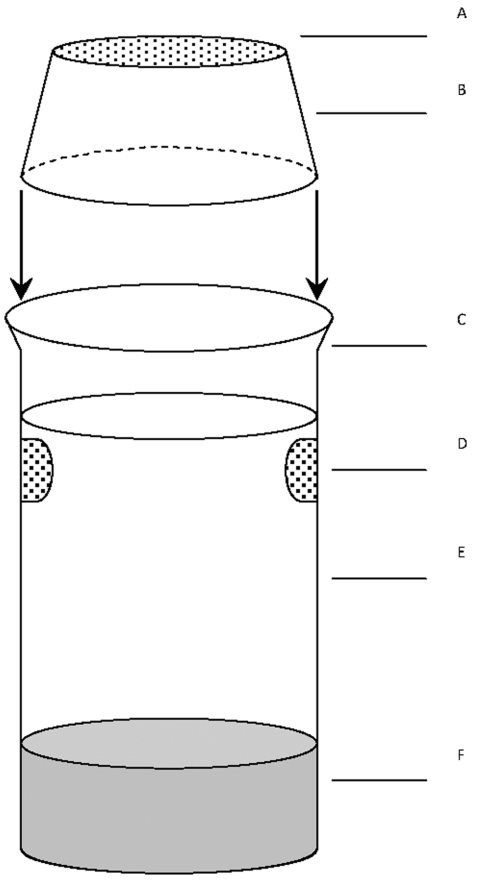
(*) Če se domneva, da bo prišlo do interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno snovjo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto (v takem primeru se torej ne sme uporabiti medij Elendt M4).

▼M4

Dodatek 5

Napotek za spremljanje preobrazbe ličink trzače

Na preskusne čaše se namestijo lovilniki za preobražene osebke. Potrebni so od 20. dne do konca preskusa. Primer lovilnika je narisan spodaj:



A: najlonska mrežica

B: obrnjen plastični lonček

C: poskusna čaša brez ustja

D: mrežasti okenci za izmenjavo vode

E: voda

F: usedlina

▼M4

C.29 DOBRA BIORAZGRADLJIVOST – CO_2 V ZAPRTIH POSODAH (PRESKUS NADPROSTORA)

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 310 (2006). Je presejalna metoda za ocenjevanje dobre biološke razgradljivosti kemikalij in daje podobne informacije kot šest preskusnih metod, opisanih v poglavju C.4, A–F, te priloge. Zato se lahko kemikalija, pri kateri so rezultati te preskusne metode pozitivni, šteje za dobro biološko razgradljivo in zato hitro razgradljivo v okolju.

2. Uveljavljena metoda z ogljikovim dioksidom (CO_2) (1), ki temelji na izvirnem Sturmovem preskusu (2) za ocenjevanje biološke razgradljivosti organskih kemikalij z merjenjem ogljikovega dioksida, ki je nastal zaradi mikrobne dejavnosti, je običajno prva izbira za preskušanje slabo topnih in močno adsorptivnih kemikalij. Izbere se tudi za topne (vendar ne hlapne) kemikalije, ker številni menijo, da je nastajanje ogljikovega dioksida edini nedvoumni dokaz mikrobne dejavnosti. Raztopljeni organski ogljik se lahko odstrani s fizikalno-kemijskimi procesi (adsorpcija, izhlapevanje, obarjanje, hidroliza) in mikrobno dejavnostjo, pri številnih nebioloških reakcijah pa se porablja kisik; CO_2 redko nastane abiotsko iz organskih kemikalij. Pri izvirnem in prilagojenem Sturmovem preskusu (1) (2) se CO_2 odstrani iz tekoče faze v posode za absorpcijo s prepihovanjem (tj. uvajanjem mehurčkov obdelanega zraka za odstranitev CO_2 prek tekočega medija), pri Larsonovi različici (3) (4) pa se CO_2 prenese iz reakcijske posode v absorberje s spuščanjem zraka brez CO_2 skozi nadprostor in dodatno z nenehnim stresanjem preskusne posode. Reaktorska posoda se stresa samo pri prilagojeni Larsonovi različici; v ISO 9439 (5) in izvirni ameriški različici (6), ki oba določata prepihovanje in ne zamenjave v nadprostoru, je mešanje predpisano samo za netopne snovi. Pri drugi uradni metodi Agencije za varstvo okolja Združenih držav (US EPA) (7), ki temelji na Gledhillovi metodi (8), je reakcijska posoda, ki se stresa, zaprta za ozračje, nastali CO_2 pa se zbira v notranjem alkalnem lovilniku neposredno iz plinske faze kot pri klasičnih Warburgovih/Barcroftovih respirometrih.

3. Toda pokazalo se je, da se pri uporabi standardnega prilagojenega Sturmovega preskusa pri številnih kemikalijah (9) v mediju nabira anorganski ogljik (IC). Pri razgradnji 20 mg C/l anilina je bila ugotovljena koncentracija IC kar 8 mg/l. Zato zbiranje CO_2 v alkalnih lovilnikih ni pravilno pokazalo količine mikrobiološko nastalega CO_2 pri vmesnih časih med razgradnjo. Zato pogoja, da je treba za uvrstitev preskusne kemikalije med dobro biološko razgradljive v „10-dnevnem obdobju“ (10 dneh, ki neposredno sledijo dosegu 10-odstotne biološke razgradljivosti) nabrati > 60 % teoretično največje količine nastalega CO_2 ($ThCO_2$), ne izpolnjujejo nekatere kemikalije, ki bi se med dobro biološko razgradljive uvrstile ob odstranjevanju raztopljenega organskega ogljika (DOC).

4. Kadar je delež razgradnje manjši, kot je bilo pričakovano, se v preskusni raztopini morda nabira IC. V takem primeru se lahko razgradljivost oceni z drugimi preskusi dobre biološke razgradljivosti.

▼M4

5. Zaradi drugih pomanjkljivosti Sturmove metodologije (okornost, dolgotrajnost, nagnjenost k eksperimentalnim napakam in neuporabnost za hlapne kemikalije) se je že prej poleg Gledhillove metode iskala tehnika z zaprtimi posodami, in ne s pretokom plina. Boatman idr. (12) so pregledali prejšnje metode in uporabili zaprt sistem z nadprostorom, pri čemer je bil CO_2 sproščen v nadprostor ob koncu inkubacije z zakisanjem medija. CO_2 se je meril z analizo s plinsko kromatografijo (GC)/IC v samodejno odvzetih vzorcih iz nadprostora, a se pri tem ni upošteval raztopljeni anorganski ogljik (DIC) v tekoči fazi. Poleg tega so bile uporabljene posode zelo majhne (20 ml) in so vsebovale samo 10 ml medija, kar je povzročalo težave, npr. pri dodajanju nujno zelo majhnih količin netopnih preskusnih kemikalij in/ali pa v inokuliranem mediju ni bilo (dovolj) mikroorganizmov, ki so sposobni razgraditi preskusne kemikalije.

6. Te težave so v neodvisnih raziskavah premagali Struijs in Stoltenkamp (13) ter Birch in Fletcher (14), pri čemer so slednja navdihnile njune izkušnje z napravo, ki se uporablja pri preskusu anaerobne biološke razgradnje (15). Pri prvi metodi (13) se CO_2 meri v nadprostoru po zakisanju in uravnoteženju, pri drugi (14) pa je bil DIC izmerjen v plinski in tekoči fazi, brez obdelave; več kot 90 % nastalega IC je bilo v tekoči fazi. Obe metodi imata prednosti pred Sturmovim preskusom, ker je preskusni sistem bolj priročen in lažje obvladljiv, ker je mogoče preskusiti hlapne kemikalije in ker je preprečena možnost zakasnitve pri merjenju nastalega CO_2.

7. Pristopa sta bila združena v standard ISO za CO_2 v nadprostoru (16), ki je bil krožno preskušen (17), na njem pa temelji tudi ta preskusna metoda. Podobno sta pristopa uporabljena v metodi US EPA (18). Priporočeni sta dve metodi merjenja CO_2, in sicer CO_2 v nadprostoru po zakisanju (13) in IC v tekoči fazi po dodajanju presežne baze. Drugo metodo je uvedel Peterson pri krožnem preskusu CONCAWE (19) te metode z nadprostorom, prilagojene za merjenje inherentne biološke razgradljivosti. Spremembe iz revizije teh metod iz leta 1992 (20) v poglavju C.4 te priloge za dobro biološko razgradljivost so bile vključene v to preskusno metodo, tako da so pogoji (medij, trajanje itd.) sicer enaki kot pri revidiranem Sturmovem preskusu (20). Birch in Fletcher (14) sta pokazala, da ta preskus nadprostora daje zelo podobne rezultate, kot so bili za iste kemikalije ugotovljeni v krožnem preskusu OECD (21) revidiranih preskusnih metod.

NAČELO PRESKUSA

8. Preskusna kemikalija, običajno 20 mg C/l, se kot edini vir ogljika in energije inkubira v pufrskem mediju z mineralnimi solmi, ki je inokuliran z mešano populacijo mikroorganizmov. Preskus se opravi v zaprtih steklenicah z nadprostorom, v katerem je zrak, ki predstavlja zalogo kisika za aerobno biološko razgradnjo. Nastajanje CO_2 zaradi popolne aerobne biološke razgradnje preskusne kemikalije se določi z merjenjem nastalega IC v preskusnih steklenicah, ki presega IC, ki nastane v posodah s slepim vzorcem, ki vsebujejo samo inokuliran medij. Obseg biološke razgradnje se izrazi kot delež teoretično največje količine nastalega IC (ThIC) na podlagi prvotno dodane količine preskusne kemikalije (kot organski ogljik).

9. Merita se lahko tudi odstranitev DOC in/ali obseg primarne biološke razgradnje preskusne kemikalije (2).

▼M4

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

10. Za izračun deleža razgradnje je treba poznati vsebnost organskega ogljika (% w/w) v preskusni kemikaliji, ki se določi na podlagi njene kemične strukture ali z merjenjem. Pri hlapnih preskusnih kemikalijah je izmerjena ali izračunana Henryjeva konstanta koristna za določanje ustreznega volumskega razmerja med nadprostorom in tekočino. Informacije o strupenosti preskusne kemikalije za mikroorganizme so koristne pri izbiri ustrezne preskusne koncentracije in za razlago rezultatov, ki kažejo slabo biološko razgradljivost. Priporoča se vključitev kontrole zaviranja, razen če je znano, da preskusna kemikalija ne zavira mikrobne dejavnosti (glej odstavek 24).

UPORABA METODE

11. Preskus se uporablja za vodotopne in netopne preskusne kemikalije, vendar je treba zagotoviti njihovo dobro porazdelitev. S priporočenim volumskim razmerjem med nadprostorom in tekočino 1 : 2 se lahko preskusijo hlapne kemikalije s Henryjevo konstanto do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, saj delež preskusne kemikalije v nadprostoru ne preseže 1 % (13). Pri preskušanju bolj hlapnih kemikalij se lahko uporabi manjša prostornina nadprostora, vendar je lahko njihova biološka razpoložljivost omejujoča, zlasti če so slabo topne v vodi. Toda uporabniki morajo zagotoviti, da sta volumsko razmerje med nadprostorom in tekočino ter koncentracija preskusne kemikalije taka, da je na voljo dovolj kisika za popolno aerobno biološko razgradnjo (npr. treba se je izogibati visoki koncentraciji substrata in majhni prostornini nadprostora). Navodila glede tega so na voljo v (13) (23).

REFERENČNE KEMIKALIJE

12. Za preverjanje preskusnega postopka je treba vzporedno preskusiti referenčno kemikalijo z znano biološko razgradljivostjo. Za ta namen se lahko pri preskušanju vodotopnih preskusnih kemikalij uporabijo anilin, natrijev benzoat ali etilen glikol, pri preskušanju slabo topnih preskusnih kemikalij pa 1-oktanol (13). Biološka razgradnja teh kemikalij mora v 14 dneh doseči > 60 % ThIC.

PONOVLJIVOST

13. Pri krožnem preskusu metode po ISO (17) so bili pri priporočenih pogojih, vključno z 20 mg C preskusne kemikalije/l, dobljeni spodnji rezultati.

Preskusna kemikalija	Povprečni delež biološke razgradnje v % (28d)	Koeficient variacije (%)	Število laboratorijev
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Variabilnost znotraj preskusa (ponovljivost) pri uporabi anilina je bila majhna, pri čemer koeficienti variacije niso presegli 5 % v skoraj nobeni izvedbi preskusa. V dveh primerih, v katerih je bila ponovljivost slabša, je bilo za večjo variabilnost verjetno krivo večje nastajanje IC v slepih vzorcih. Pri 1-oktanolu je bila ponovljivost slabša, vendar je bila še vedno manjša od 10 % pri 79 % izvedenih preskusov. Za to večjo variabilnost znotraj preskusa so lahko krive napake pri odmerjanju, saj je treba v zaprte preskusne steklenice vbrizgati majhno količino 1-oktanola (3 do 4 µl). Višji koeficienti variacije nastanejo pri nižjih koncentracijah preskusne kemikalije, zlasti pri koncentracijah pod 10 mg C/l. Temu se je mogoče delno izogniti z znižanjem koncentracije skupnega anorganskega ogljika (TIC) v inokulumu.

▼**M4**

14. Pri krožnem preskusu EU (24) petih površinsko aktivnih snovi, dodanih v 10 mg C/l, so bili dobljeni naslednji rezultati:

Preskusna kemikalija	Povprečni delež biološke razgradnje v % (28d)	Koeficient variacije (%)	Število laboratorijev
Tetrapropilen benzen sulfonat	17	45	10
Diizooktilsulfo-sukcinat (anionski)	72	22	9
Heksadecil-trimetil (*) amonijev klorid (kationski)	75	13	10
Izononilfenol-(etoksilat)$_9$ (neionski)	41	32	10
Kokoamidopropil dimetilhidroksi sulfobetain (amfoteričen)	60	23	11

(*) SiO_2 je bil dodan za nevtralizacijo strupenosti.

Rezultati kažejo, da je bila na splošno variabilnost večja pri slabše razgrajenih površinsko aktivnih snoveh. Variabilnost znotraj poskusa je bila manjša od 15 % v 90 % primerov, dosegla pa je največ 30–40 %.

OPOMBA: večine površinsko aktivnih snovi ne sestavlja ena sama molekulska vrsta, temveč so mešanica izomerov, homologov itd., ki se razgradijo po različnih značilnih časih prilagajanja in z različno kinetično hitrostjo, zaradi česar nastanejo „zabrisane“ oslabele krivulje, tako da v 10-dnevnem obdobju ni mogoče doseči praga 60 %, čeprav bi vsaka posamezna molekulska vrsta v 10 dneh dosegla > 60 %, če bi se preskušala sama. To je bilo ugotovljeno tudi pri drugih kompleksnih mešanicah.

OPIS METODE

Oprema

15. Običajna laboratorijska oprema in:

(a) steklene serumske steklenice, zatesnjene z zamaški iz butilne gume in stisnjenimi aluminijskimi tesnili. Priporočena velikost je „125 ml“, pri čemer je celotna prostornina takih steklenic 160 ml (v tem primeru bi moralo biti znano, da je prostornina posamezne steklenice 160 ± 1 ml). Manjše steklenice se lahko uporabijo, kadar rezultati izpolnjujejo pogoje iz odstavkov 66 in 67;

(b) analizator ogljika ali drug instrument (npr. plinski kromatograf) za merjenje anorganskega ogljika;

▼M4

(c) zelo natančne brizge za plinaste in tekoče vzorce;

(d) krožni stresalnik v temperaturno nadzorovanem okolju;

(e) dotok zraka brez CO_2 – pripravi se lahko s spuščanjem zraka skozi zrnca zmesi natrijevega in kalcijevega hidroksida ali z uporabo plinske mešanice 80 % N_2 / 20 % 0_2 (neobvezno) (glej odstavek 28);

(f) naprava za membransko filtracijo poroznosti od 0,20 do 0,45 μm (neobvezno);

(g) analizator organskega ogljika (neobvezno).

Reagenti

16. Ves čas se uporabljajo analitsko čisti reagenti.

Voda

17. Uporabljati je treba destilirano ali deionizirano vodo, ki vsebuje ≤ 1 mg/l skupnega organskega ogljika. To predstavlja ≤ 5 % začetne vsebnosti organskega ogljika, uvedene s priporočenim odmerkom preskusne kemikalije.

Založne raztopine za medij z mineralnimi solmi

18. Založne raztopine in medij z mineralnimi solmi so podobni kot pri preskusih ISO 14593 (16) in C.4 „dobra biološka razgradljivost“ (20). Večja koncentracija amonijevega klorida (2,0 g/l namesto 0,5 g/l) bi morala biti potrebna samo v zelo izjemnih primerih, npr. kadar je koncentracija preskusne kemikalije > 40 mg C/l. Založne raztopine je treba hraniti na hladnem in jih zavreči po šestih mesecih ali prej, če se pokažejo znaki obarjanja ali mikrobne rasti. Pripravijo se naslednje osnovne raztopine:

(a) kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

amonijev klorid (NH_4Cl) 0,50 g

Raztopijo se v vodi in dopolnijo do 1 litra. pH te raztopine mora biti 7,4 (± 0,2). Če ni, je treba pripraviti novo raztopino.

(b) kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Raztopi se v vodi in dopolni do 1 litra.

(c) magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Raztopi se v vodi in dopolni do 1 litra.

(d) železov (III) klorid heksahidrat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Raztopi se v vodi in dopolni do 1 litra ter doda kapljica koncentrirane HCl.

Priprava mineralnega medija

19. Zmeša se 10 ml raztopine (a) in približno 800 ml vode (odstavek 17), nato se doda po 1 ml raztopin (b), (c) in (d) ter dopolni z vodo do 1 litra (odstavek 17).

Drugi reagenti

20. Koncentrirana ortofosforna kislina (H_3PO_4) (> 85 % mase na volumen).

▼M4

Raztopina natrijevega hidroksida 7M

21. 280 g natrijevega hidroksida (NaOH) se raztopi v 1 litru vode (odstavek 17). Določi se koncentracija DIC za to raztopino, ta vrednost pa se upošteva pri izračunu rezultata preskusa (glej odstavka 55 in 61), zlasti ob upoštevanju merila veljavnosti iz odstavka 66(b). Če je koncentracija DIC previsoka, se pripravi sveža raztopina.

Preskusna kemikalija

22. Pripravi se osnovna raztopina preskusne kemikalije, ki se dovolj dobro topi v vodi (odstavek 17) ali preskusnem mediju (odstavek 19), s koncentracijo, ki je po možnosti 100-krat višja od končne koncentracije, ki bo uporabljena v preskusu; morda bo treba pH osnovne raztopine prilagoditi. Založno raztopino je treba dodati mineralnemu mediju, da nastane končna koncentracija organskega ogljika, ki znaša med 2 in 40 mg C/l, po možnosti 20 mg C/l. Če se uporabijo nižje koncentracije, se lahko natančnost poslabša. V posode se lahko neposredno z zelo natančnimi brizgami dodajo topne in netopne tekoče kemikalije. Pri slabo topnih in netopnih preskusnih kemikalijah je lahko potrebna posebna obdelava (25). Na izbiro so:

(a) neposredno dodajanje znanih tehtanih količin;

(b) ultrazvočno dispergiranje pred dodajanjem;

(c) dispergiranje z emulgatorji; pred dodajanjem je treba ugotoviti, ali imajo zaviralne ali spodbujevalne učinke na mikrobno dejavnost;

(d) adsorpcija tekočih preskusnih kemikalij ali raztopine v primernem hlapnem topilu na inertni medij ali nosilec (npr. filter iz steklenih vlaken), ki ji sledi izhlapevanje topila, če je uporabljeno, in neposredno dodajanje znanih količin;

(e) dodajanje znanih količin raztopine preskusne kemikalije v lahko hlapnem topilu v prazno preskusno posodo, ki mu sledi izhlapevanje topila.

Preskusiti je treba spodbujevalni ali zaviralni učinek sredstev in topil, uporabljenih v (c), (d) in (e), na mikrobno dejavnost (glej odstavek 42(b)).

Referenčna kemikalija

23. Pripravi se osnovna raztopina (topne) referenčne kemikalije v vodi (odstavek 17) s koncentracijo, ki je po možnosti 100-krat višja od končne koncentracije, ki bo uporabljena v preskusu (20 mg C/l).

Preverjanje zaviranja

24. Preskusne kemikalije pogosto ne pokažejo znatne razgradnje v pogojih, uporabljenih pri ocenjevanjih dobre biološke razgradljivosti. Eden od mogočih vzrokov je ta, da preskusna kemikalija zavira inokulum pri koncentraciji, ki je uporabljena v preskusu. V načrt preskusa se lahko vključi preverjanje zaviranja, da se omogoči ugotavljanje (za nazaj) zaviranja kot mogočega vzroka ali prispevajočega dejavnika. S preverjanjem zaviranja je mogoče tudi ovreči take motnje in pokazati, da se lahko nična ali rahla razgradnja pripiše izključno nedovzetnosti za napad mikrobov v pogojih preskusa. Za pridobitev informacij o strupenosti preskusne kemikalije za (aerobne) mikroorganizme se pripravi raztopina v preskusnem mediju, ki vsebuje enako koncentracijo preskusne kemikalije in referenčne kemikalije (odstavek 19), kot je bila dodana (glej odstavka 22 in 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum se lahko pridobi iz različnih virov: aktivnega blata, komunalnih odplak (nekloriranih), površinskih voda in tal ali zmesi teh sestavin (20). Biorazgradno aktivnost vira je treba preveriti z referenčno kemikalijo. Ne glede na vir se ne smejo uporabiti mikroorganizmi, ki so bili že prej izpostavljeni preskusni kemikaliji, če se postopek uporablja kot preskus dobre biološke razgradljivosti.

Opozorilo: aktivno blato, odpadne vode in komunalne odplake vsebujejo patogene organizme, zato je treba z njimi ravnati previdno.

26. Glede na izkušnje je optimalna količina inokuluma taka, ki:

— zadostuje za primerno biološko razgradno aktivnost,

— razgradi predpisani delež referenčne kemikalije (glej odstavek 66),

— daje 10^2 do 10^5 enot, ki tvorijo kolonije, na mililiter končne mešanice,

— pri uporabi aktivnega blata običajno daje koncentracijo 4 mg/l neraztopljenih trdnih snovi v končni mešanici; uporabijo se lahko koncentracije do 30 mg/l, vendar lahko te znatno povečajo nastajanje CO_2 v slepih vzorcih (26),

— prispeva manj kot 10 % začetne koncentracije organskega ogljika, uvedenega s preskusno kemikalijo,

— običajno znaša 1–10 ml inokuluma za 1 liter preskusne raztopine.

Aktivno blato

27. Iz prezračevalnega bazena čistilne naprave ali laboratorijske enote, v kateri se čistijo predvsem gospodinjske odplake, se vzame svež vzorec aktivnega blata. Po potrebi se grobi delci odstranijo s presejanjem (npr. s sitom z 1 mm^2 velikimi luknjicami), blato pa je treba do uporabe ohranjati v aerobnem stanju.

28. Po odstranitvi grobih delcev se lahko tudi pusti, da se usede, ali se centrifugira (npr. 10 minut pri 1 100 × g). Supernatantna tekočina se zavrže. Blato se lahko spere v mineralni raztopini. Koncentrirano blato se suspendira v mineralnem mediju tako, da bo koncentracija neraztopljenih trdnih snovi 3–5 g/l. Nato se prezračuje do uporabe.

29. Blato je treba odvzeti iz pravilno delujoče konvencionalne čistilne naprave. Če ga je bilo treba odvzeti iz čistilne naprave z visoko stopnjo čiščenja ali če se domneva, da vsebuje zaviralce, ga je treba sprati. Resuspendirano blato se po temeljitem mešanju pusti, da se usede, ali se centrifugira, supernatantna tekočina se zavrže, sprano blato pa znova suspendira v dodatni količini mineralnega medija. Postopek se ponavlja, dokler se ne šteje, da je blato brez presežnega substrata ali zaviralcev.

30. Tik pred uporabo popolnoma resuspendiranega ali neobdelanega blata se odvzame vzorec za določitev suhe teže neraztopljenih trdnih snovi.

31. Dodatna možnost je, da se aktivno blato homogenizira (3–5 g neraztopljenih trdnih snovi/l). Blato se 2 minuti obdeluje z Waringovim mešalnikom pri srednji hitrosti. Zmešano blato se mora usedati 30 minut, če je potrebno, pa tudi dlje, nato pa se odlije tekočina, ki se uporabi kot inokulum v koncentraciji približno 10 mg/l mineralnega medija.

▼M4

32. Nastajanje CO_2 v slepih vzorcih je mogoče dodatno zmanjšati, če se blato čez noč prezračuje z zrakom brez CO_2. Kot koncentracija inokuluma pri tem preskusu (13) se uporabi 4 mg/l aktivnega blata v obliki trdnih snovi.

Sekundarni komunalni iztok

33. Inokulum se lahko pridobi tudi iz sekundarnega iztoka iz čistilne naprave ali laboratorijske enote, v katero priteka predvsem gospodinjska odpadna voda. Vzorec se hrani v aerobnih pogojih in uporabi na dan odvzema ali pa se po potrebi aklimatizira. Iztok je treba filtrirati skozi grobi filter, da se odstranijo večji delci, in izmeriti vrednost pH.

34. Za zmanjšanje vsebnosti IC se filtrat 1 uro prepihuje z zrakom brez CO_2 (odstavek 15(e)) ob ohranjanju vrednosti pH 6,5 z ortofosforno kislino (odstavek 20). Vrednost pH se vrne na prvotno vrednost z natrijevim hidroksidom (odstavek 21). Po približno 1-urnem usedanju se vzame primerna količina supernatanta za inokulacijo. Ta postopek prepihovanja zmanjša vsebnost IC v inokulumu. Ko je bila na primer kot inokulum uporabljena največja priporočena količina filtriranega prepihanega iztoka (100 ml) na liter, je bilo v posodah s slepim kontrolnim vzorcem med 0,4 in 1,3 mg/l IC (14), kar je predstavljalo 2–6,5 % C iz preskusne kemikalije pri 20 mg C/l in 4–13 % pri 10 mg C/l.

Površinske vode

35. Vzame se vzorec primerne površinske vode. Hrani se v aerobnih pogojih in uporabi na dan odvzema. Po potrebi se koncentrira s filtriranjem ali centrifugiranjem. Količina inokuluma, ki se uporabi v posamezni preskusni posodi, mora izpolnjevati merila iz odstavka 26.

Tla

36. V globini do 20 cm pod površino se vzame vzorec ustreznih tal. Iz njega je treba pred presejanjem skozi sito z 2 mm velikimi luknjicami odstraniti kamne, ostanke rastlin in nevretenčarje (če je vzorec prevlažen za takojšnje presejanje, se za lažje presejanje delno posuši na zraku). Hraniti ga treba v aerobnih pogojih in uporabiti na dan jemanja (če se vzorec prevaža v ohlapno zavezani polietilenski vrečki, se lahko največ en mesec hrani v vrečki pri 2 do 4 °C).

Aklimatizacija inokuluma

37. Inokulum se lahko aklimatizira na preskusne pogoje, ne sme pa se prilagoditi na preskusno kemikalijo. Z aklimatizacijo je mogoče zmanjšati nastajanje CO_2 v slepem vzorcu. Aklimatizacija vključuje prezračevanje aktivnega blata po razredčitvi v preskusnem mediju na 30 m/l z vlažnim zrakom brez CO_2 5–7 dni pri temperaturi preskusa.

PRESKUSNI POSTOPEK

Število steklenic

38. Število steklenic (odstavek 15(a)), potrebnih za preskus, je odvisno od pogostosti analize in trajanja preskusa.

39. Priporoča se, da se po zadostnem številu časovnih intervalov analizirajo po tri steklenice, tako da je mogoče določiti 10-dnevno obdobje. Ob koncu preskusa se analizira tudi vsaj pet preskusnih steklenic (odstavek 15(a)) iz skupin (a), (b) in (c) (glej odstavek 42), da je mogoče izračunati 95-odstotne intervale zaupanja za srednjo vrednost deleža biološke razgradnje.

▼M4

Inokulirani medij

40. Inokulum se uporabi v koncentraciji 4 mg/l aktivnega blata v obliki suhih trdnih snovi. Tik pred uporabo se pripravi dovolj inokuliranega medija tako, da se na primer 1 litru medija z mineralnimi solmi (odstavek 19) doda 2 ml ustrezno obdelanega aktivnega blata (odstavki 27 do 32) pri 2 000 mg/l. Pri uporabi sekundarnega komunalnega iztoka se v 900 ml medija z mineralnimi solmi (odstavek 19) doda do 100 ml iztoka (odstavek 33) in z medijem razredči na 1 liter.

Priprava steklenic

41. Alikvoti inokuliranega medija se odmerijo v ponovitvene steklenice, da nastane razmerje med nadprostorom in tekočino 1 : 2 (npr. v 160-mililitrske steklenice se da 107 ml). Uporabijo se lahko tudi druga razmerja, vendar je treba upoštevati opozorilo iz odstavka 11. Pri uporabi katere koli vrste inokuluma je treba poskrbeti za to, da je inokulirani medij primerno zmešan, tako da se zagotovi njegova enakomerna porazdeljenost po preskusnih steklenicah.

42. Pripravijo se skupine steklenic (odstavek 15(a)), ki vsebujejo naslednje:

(a) preskusne posode (označene s F_T), ki vsebujejo preskusno kemikalijo;

(b) slepe kontrolne vzorce (označene s F_B), ki vsebujejo samo preskusni medij in inokulum; dodati je treba tudi vse kemikalije, topila, sredstva ali filtre iz steklenih vlaken, ki se uporabljajo za uvajanje preskusne kemikalije v preskusne posode;

(c) posode (označene s F_C) za preverjanje postopka, ki vsebujejo referenčno kemikalijo;

(d) po potrebi posode (označene s F_I) za preverjanje morebitnega zaviralnega učinka preskusne kemikalije, ki vsebujejo enako koncentracijo preskusne kemikalije in referenčne kemikalije (odstavek 24) kot v steklenicah F_T oziroma F_C;

(e) posode (označene s F_S) za preverjanje morebitne abiotske razgradnje, enako kot (a) z dodatkom 50 mg/l $HgCl_2$ ali se sterilizirajo drugače (npr. z avtoklaviranjem).

43. Vodotopne preskusne kemikalije in referenčne kemikalije se dodajo kot vodne osnovne raztopine (odstavki 22, 23 in 24), da nastane koncentracija 10 do 20 mg C/l.

44. Netopne preskusne kemikalije in netopne referenčne kemikalije se dodajo v steklenice na različne načine (glej odstavek 22(a–e)), glede na naravo preskusne kemikalije bodisi pred dodatkom inokuliranega medija ali po njem, odvisno od načina obdelave preskusne kemikalije. Če se uporabi eden od postopkov iz odstavka 22(a–e), je treba s steklenicami F_B s slepim vzorcem (odstavek 42(b)) ravnati podobno, vendar brez preskusne kemikalije in referenčne kemikalije.

45. Hlapne preskusne kemikalije je treba vbrizgati v zaprte posode (odstavek 47) z mikrobrizgo. Odmerek se izračuna iz vbrizgane količine in gostote preskusne kemikalije.

46. Po potrebi je treba v posode dodati vodo, da je v vsaki posodi enaka količina tekočine. Treba je zagotoviti, da sta razmerje med nadprostorom in tekočino (običajno 1 : 2) ter koncentracija preskusne kemikalije taka, da je v nadprostoru na voljo dovolj kisika za popolno biološko razgradnjo.

▼M4

47. Vse steklenice se nato zatesnijo, na primer s septumi iz butilne gume in aluminijastimi pokrovčki. V tej fazi je treba dodati hlapne preskusne kemikalije (odstavek 45). Če je treba spremljati zniževanje koncentracije DOC v preskusni raztopini in če je treba za začetno koncentracijo IC (sterilni kontrolni vzorci, odstavek 42(e)) ali druge determinante opraviti analizo ob času nič, se iz preskusne posode odvzame ustrezni vzorec. Preskusna posoda in njena vsebina se nato zavržeta.

48. Zaprte posode se položijo na rotacijski stresalnik (odstavek 15(d)), pri čemer mora biti hitrost stresanja zadostna, da vsebina steklenic ostaja dobro premešana in v obliki suspenzije (npr. 150 do 200 vrtljajev na minuto), ter se inkubirajo v temi pri 20 °C, pri čemer se temperatura ohranja v razponu ± 1 °C.

Vzorčenje

49. Način vzorčenja je odvisen od časa prilagajanja in kinetične hitrosti biološke razgradnje preskusne kemikalije. Steklenice se za analizo žrtvujejo na dan vzorčenja, kar bi moralo biti vsaj tedensko ali pogosteje (npr. dvakrat tedensko), če je potrebna popolna krivulja razgradnje. Iz stresalnika se vzame potrebno število ponovitvenih steklenic, ki predstavljajo F_T, F_B in F_C ter F_I in F_S, če sta uporabljena (glej odstavek 42). Preskus običajno traja 28 dni. Če krivulja biološke razgradnje kaže, da je bila konstantna raven dosežena pred 28. dnem, se lahko preskus konča prej kot v 28 dneh. Vzamejo se vzorci iz petih steklenic, prihranjenih za 28. dan preskusa za analizo, rezultati pa se uporabijo za izračun intervala zaupanja ali koeficienta variacije deleža biološke razgradnje. Steklenic, ki se uporabljajo za preverjanje zaviranja in abiotske razgradnje, ni treba vzorčiti tako pogosto kot druge steklenice; zadostuje vzorčenje 1. in 28. dan.

Analiza anorganskega ogljika (IC)

50. Nastajanje CO_2 v steklenicah se določi z merjenjem povečanja koncentracije anorganskega ogljika (IC) med inkubacijo. Za merjenje količine IC, ki nastane pri preskusu, sta na voljo dve priporočeni metodi, ki sta opisani spodaj. Ker se lahko njuni rezultati med seboj nekoliko razlikujejo, naj se v posameznem preskusu uporabi samo ena od njiju.

51. Metoda (a) je priporočena, če medij verjetno vsebuje ostanke, na primer, filtrirnega papirja iz steklenih vlaken in/ali netopne preskusne kemikalije. Ta analiza se lahko izvede s plinskim kromatografom, če ni na voljo analizator organskega ogljika. Pomembno je, da imajo steklenice pri analizi plina v nadprostoru preskusno temperaturo ali da je njihova temperatura blizu preskusne temperature. Metoda (b) je morda lažja za laboratorije, ki za merjenje IC uporabljajo analizator ogljika. Pomembno je, da je raztopina natrijevega hidroksida (odstavek 21), ki se uporablja za pretvorbo CO_2 v karbonat, bodisi sveže pripravljena ali pa je znana vsebnost IC v njej, tako da se ta lahko upošteva pri izračunavanju preskusnih rezultatov (glej odstavek 66(b)).

Metoda (a): zakisanje na pH < 3

52. Pred vsako serijo analiz se analizator IC umeri z ustreznim standardom za IC (npr. 1 % w/w CO_2 v N_2). Koncentrirana ortofosforna kislina (odstavek 20) se vbrizga skozi septum posamezne vzorčene steklenice, da se pH medija zniža na < 3 (npr. 107 ml preskusnega medija dodamo 1 ml). Steklenice se vrnejo na stresalnik. Po enournem stresanju pri preskusni temperaturi se odstranijo s stresalnika, iz nadprostora posamezne steklenice pa se odvzamejo alikvoti (npr. 1 ml) plina in vbrizgajo v analizator IC. Izmerjene koncentracije IC se zapišejo kot mg C/l.

▼M4

53. Načelo te metode je, da je po zakisanju na pH < 3 in uravnoteženju pri 20 °C konstanta ravnotežja za porazdelitev CO_2 med tekočinsko in plinsko fazo v preskusnih steklenicah 1,0, če je merjena kot koncentracija (13). To je treba za preskusni sistem dokazati vsaj enkrat na naslednji način:

Pripravijo se steklenice, ki vsebujejo 5 in 10 mg/l IC, tako da se uporabi raztopina brezvodnega natrijevega karbonata (Na_2CO_3) v vodi brez CO_2, ki se pripravi z zakisanjem vode na pH 6,5 s koncentrirano ortofosforno kislino (odstavek 20), prepihovanjem z zrakom brez CO_2 čez noč in povišanjem pH na nevtralno vrednost z bazo. Zagotovi se, da je razmerje med prostornino nadprostora in količino tekočine enako kot pri preskusih (npr. 1 : 2). Tekočina se zakisa in uravnoteži, kot je opisano v odstavku 52, nato se izmerijo koncentracije IC v nadprostoru in tekoči fazi. Preveri se, da sta koncentraciji enaki znotraj preskusne napake. Če nista, bi moral izvajalec pregledati postopke. Porazdelitve IC med tekočo in plinasto fazo ni treba preverjati vsakokrat, ko se izvaja preskus; verjetno se lahko preveri pri umerjanju.

54. Če je treba izmeriti odstranjeni DOC (samo pri vodotopnih preskusnih kemikalijah), je treba iz ločenih (nezakisanih) steklenic vzeti vzorce tekoče faze, jih filtrirati skozi membranski filter in vbrizgati v analizator DOC. Te steklenice se lahko po potrebi uporabijo za druge analize za merjenje primarne biološke razgradnje.

Metoda (b): pretvorba CO_2 v karbonat

55. Pred vsako serijo analiz se analizator IC umeri z ustreznim standardom, na primer raztopino natrijevega bikarbonata ($NaHCO_3$) v vodi brez CO_2 (glej odstavek 53) v razponu od 0 do 20 mg/l kot IC. Skozi septum posamezne vzorčene steklenice se vbrizga raztopina natrijevega hidroksida (7M, odstavek 21) (npr. 1 ml se doda 107 ml medija), nato se steklenice eno uro stresajo pri preskusni temperaturi. Pri vseh steklenicah, žrtvovanih na določeni dan, se uporabi enaka raztopina NaOH, ni pa nujno, da se enaka raztopina uporabi pri vsakem vzorčenju v preskusu. Če so pri vseh vzorčenjih potrebne absolutne vrednost IC v slepem vzorcu, je treba ob vsaki uporabi raztopine NaOH v njej določiti IC. Steklenice se odstranijo s stresalnika, da se vsebina usede. Z brizgo se iz vsake posode odvzame ustrezna količina (npr. 50 do 1 000 µl) tekoče faze. Vzorci se vbrizgajo v analizator IC, nato se zapišejo koncentracije IC. Treba je zagotoviti, da je uporabljeni analizator ustrezno opremljen za uporabo bazičnih vzorcev, ki nastanejo pri tej metodi.

56. Načelo te metode je, da je koncentracija IC v nadprostoru po dodajanju baze in stresanju zanemarljiva. To je treba za preskusni sistem preveriti vsaj enkrat s standardi za IC, dodajanjem baze in uravnoteženjem ter merjenjem koncentracije IC v nadprostoru in tekoči fazi (glej odstavek 53). Koncentracija v nadprostoru bi morala biti blizu nič. Tega preverjanja skoraj popolne absorpcije CO_2 ni treba opravljati pri vsakem preskusu.

57. Če je treba izmeriti odstranitev DOC (samo pri vodotopnih preskusnih kemikalijah), je treba iz ločenih steklenic (ki ne vsebujejo dodane baze) vzeti vzorce tekoče faze, jih filtrirati skozi membranski filter in vbrizgati v analizator DOC. Te steklenice se lahko po potrebi uporabijo pri drugih analizah za merjenje primarne biološke razgradljivosti.

▼M4

PODATKI IN POROČANJE

Izračun rezultatov

58. Ob predpostavki, da je mineralizacija preskusne kemikalije v CO_2 100-odstotna, je presežni ThIC, ki nastane v slepih kontrolnih vzorcih, enak TOC, dodanemu posamezni preskusni steklenici na začetku preskusa, in sicer:

$$ThIC = TOC$$

.

Skupna masa (mg) anorganskega ogljika (TIC) v posamezni steklenici je:

$$TIC = (\text{mg C v tekočini} + \text{mg C v nadprostoru}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{enačba [1],}$$

pri čemer je:

V_L = količina tekočine v steklenici (l),

CL = koncentracija IC v tekočini (ogljik v mg/l),

VH = prostornina nadprostora (l),

CH = koncentracija IC v nadprostoru (ogljik v mg/l).

Izračuni TIC za dve analitični metodi, uporabljeni za merjenje IC v tem preskusu, so opisani spodaj v odstavkih 60 in 61. Delež biološke razgradnje (*% D*) v posameznem primeru se dobi na naslednji način:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{enačba [2],}$$

pri čemer je:

TIC_t = mg TIC v preskusni steklenici ob času t,

TIC_b = srednja vrednost mg TIC v steklenicah s slepim vzorcem ob času t,

TOC = mg TOC, dodanega v preskusno posodo na začetku.

Delež biološke razgradnje % D se izračuna za preskusne steklenice (F_T), referenčne steklenice (F_C) in kontrolne steklenice za spremljanje zaviranja (F_I), če so vključene, iz zadevnih količin TIC, nastalega do posameznega časa vzorčenja.

59. Če se je v sterilnih kontrolnih vzorcih (F_S) vsebnost TIC v preskusnem obdobju znatno povečala, je mogoče sklepati o abiotski razgradnji preskusne kemikalije, kar je treba upoštevati pri izračunu D v enačbi [2].

Zakisanje na pH < 3

60. Ker se z zakisanjem na pH < 3 in uravnoteženjem koncentracije TIC v tekoči in plinasti fazi izenači, je treba izmeriti samo koncentracijo IC v plinasti fazi. Tako iz enačbe [1] sledi $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, pri čemer je V_B = prostornina serumske steklenice.

Pretvorba CO_2 v karbonat

61. Pri tej metodi se izračuni izvedejo kot pri enačbi [1], vendar se zanemarljiva količina IC v plinasti fazi zanemari, tako da je $V_H \times C_H = 0$, $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Prikaz rezultatov

62. Krivulja biološke razgradnje se dobi z grafičnim prikazom deleža biološke razgradnje D v odvisnosti od časa inkubacije, po možnosti pa se prikažejo faza prilagajanja, faza biološke razgradnje, 10-dnevno obdobje in faza konstantne ravni, ki je faza, v kateri je dosežena največja razgradnja, krivulja biološke razgradnje pa se zravna. Če se za vzporedne preskusne posode F_T dobijo primerljivi rezultati (< 20-odstotna razlika), se grafično prikaže srednja krivulja (glej Dodatek 2, slika 1); če ne, se krivulje prikažejo za vsako posamezno posodo. Določi se srednja vrednost deleža biološke razgradnje v fazi konstantne ravni ali oceni najvišja vrednost (npr. kadar krivulja v fazi konstantne vrednosti pada), vendar je pomembno oceniti, da vrednost v slednjem primeru ni izjema. V poročilu o preskusu se ta najvišja raven biološke razgradnje navede kot „stopnja biološke razgradnje preskusne kemikalije“. Če je bilo število preskusnih posod nezadostno za označitev faze konstantne ravni, se za izračun srednje vrednosti uporabijo izmerjeni podatki za zadnji dan preskusa. Ta zadnja vrednost, srednja vrednost petih ponovitev, se uporabi za označitev natančnosti, s katero je bil določen delež biološke razgradnje. Poroča se tudi o vrednosti, dobljeni na koncu 10-dnevnega obdobja.

63. Enako se grafično prikaže krivulja za referenčno kemikalijo F_C ter preverjanje abiotskega izločanja F_S in kontrola zaviranja F_I, če sta vključena.

64. Količine TIC v slepih kontrolnih vzorcih (F_B) in bučkah F_S (abiotsko preverjanje) se zapišejo, če so te posode vključene v preskus.

65. Na podlagi teoretično nastalega IC, pričakovanega samo glede na referenčno sestavino mešanice, se izračuna D za posode F_I. Če je 28. dan $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, je mogoče sklepati, da je preskusna kemikalija zavrla aktivnost inokuluma, kar je lahko razlog za nizke vrednosti D_{FT}, dobljene v pogojih preskusa. V tem primeru se lahko preskus ponovi pri nižji preskusni koncentraciji ter po možnosti z zmanjšanjem DIC v inokulumu in TIC, ki nastane v slepih kontrolnih vzorcih, saj se bo sicer zaradi nižje koncentracije zmanjšala natančnost metode. Uporabiti pa je mogoče tudi drug inokulum. Če je v bučki F_S (abiotski) opaženo bistveno povečanje (> 10-odstotno) količine TIC, je morda prišlo do procesa abiotske razgradnje.

Veljavnost rezultatov

▼M7

66. Šteje se, da je preskus veljaven, če:

a) je povprečni odstotek razgradnje v posodah F_C, ki vsebujejo referenčno kemikalijo, > 60-odstoten do 14. dneva inkubacije in

b) je povprečna količina TIC v slepih kontrolnih vzorcih F_B ob koncu preskusa > 3 mg C/l.

Če tem omejitvam ni zadoščeno, je treba preskus ponoviti z inokulumom iz drugega vira in/ali pregledati uporabljene postopke. Če je na primer težava velika količina nastajanja IC v slepem vzorcu, je treba uporabiti postopek iz odstavkov 27–32.

(1) Odstotni delež razgradnje v posodah F_C, ki vsebujejo referenčno snov.
(2) Odstotni delež razgradnje v posodah F_I.

▼M4

67. Če preskusna kemikalija ne doseže 60 % ThIC in zanjo ni dokazan zaviralni učinek (odstavek 65), je mogoče preskus ponoviti s povečano koncentracijo inokuluma (do 30 mg/l aktivnega blata in 100 ml iztoka/l) ali z inokulumi iz drugih virov, zlasti če je bila razgradnja 20- do 60-odstotna.

Razlaga rezultatov

68. Če je pri tem preskusu v 10-dnevnem obdobju biološka razgradnja ThIC > 60-odstotna, to pomeni, da je preskusna kemikalija v aerobnih pogojih dobro razgradljiva.

69. Če prag 60 % ThIC ni dosežen, se določi vrednost pH v medijih v steklenicah, ki niso bile zakisane ali alkalizirane; vrednost pod 6,5 lahko nakazuje, da je prišlo do nitrifikacije. V tem primeru se preskus ponovi s pufrsko raztopino z višjo koncentracijo.

Poročilo o preskusu

70. Oblikuje se preglednica, ki prikazuje odstotni delež D za vsako preskusno steklenico (F_T), referenčno steklenico (F_C) in steklenico za kontrolo zaviranja (F_I), če je vključena, za vsak dan vzorčenja. Če so za ponovitvene steklenice rezultati primerljivi, se grafično prikaže krivulja srednjega odstotnega deleža D v odvisnosti od časa. Zapišejo se količina TIC v slepih vzorcih (F_B) in sterilnih kontrolnih vzorcih (F_S), DOC in/ali drugi determinanti ter njihov delež odstranitve.

71. Določi se srednja vrednost deleža D v fazi konstantne ravni ali uporabi največja vrednost, če krivulja biološke razgradnje v fazi konstantne ravni pada, ter se navede kot „stopnja biološke razgradnje preskusne kemikalije“. Pomembno je zagotoviti, da v slednjem primeru najvišja vrednost ni izjema.

72. V poročilu o preskusu morajo biti naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

— splošno ime, kemijsko ime, številka CAS, strukturna formula in pomembne fizikalno-kemijske lastnosti,

— čistost (nečistote) preskusne kemikalije.

Preskusni pogoji:

— sklicevanje na to preskusno metodo,

— opis uporabljenega preskusnega sistema (npr. prostornina posode, razmerje med nadprostorom in tekočino, način mešanja itd.),

— uporaba preskusne in referenčne kemikalije v preskusnem sistemu: uporabljena preskusna koncentracija in količina ogljika, odmerjena v posamezno preskusno steklenico, ter morebitna uporaba topil,

— podrobnosti o uporabljenem inokulumu, morebitna predobdelava in aklimatizacija,

— inkubacijska temperatura,

— validacija načela analize IC,

— glavne značilnosti uporabljenega analizatorja IC (in drugih uporabljenih analitičnih metod),

— število ponovitev.

Rezultati:

— neobdelani podatki in izračunane vrednosti biološke razgradljivosti v obliki preglednice,

▼M4

— graf odstotnega deleža razgradnje v odvisnosti od časa za preskusne in referenčne kemikalije, faza prilagajanja, faza razgradnje, 10-dnevno obdobje in naklon,

— odstotni delež odstranitve v fazi konstantne ravni, ob koncu preskusa in po 10-dnevnem obdobju,

— razlogi za morebitno zavrnitev rezultatov preskusa,

— drugi dejavniki, ki so pomembni za uporabljeni postopek,

— razprava o rezultatih.

VIRI:

(1) Poglavje C.4 te priloge, Določanje „dobre“ biorazgradljivosti – preskus razvijanja CO_2 (metoda C.4-C)

(2) Sturm, R. N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,. Oil Chem Soc. 50: 159–167.

(3) Larson, R. J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

(4) Larson, R. J., Hansmann, M. A. in Bookland, E. A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

(5) ISO 9439 (1990; revidiran leta 1999). Kakovost vode – Vrednotenje popolne aerobne biološke razgradljivosti organskih snovi v vodi – Preskus z merjenjem sproščenega ogljikovega dioksida (Sturm)

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill, W. E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

(9) Weytjens, D., Van Ginneken, I., in Painter, H. A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

(10) Ennis, D. M., in Kramer, A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

(11) Ennis, D. M., Kramer, A., Jameson, C. W., Mazzoccki, P. H., in Bailey, P. H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

(12) Boatman, R. J., Cunningham, S. L., in Ziegler, D. A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

(13) Struijs, J., in Stoltenkamp, J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

(14) Birch, R. R., in Fletcher, R. J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

(15) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., in Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999). Kakovost vode – Vrednotenje popolne aerobne biorazgradljivosti organskih spojin v aerobnem mediju – Metoda z analizo anorganskega ogljika v zaprtih posodah (preskus CO_2 v nadprostoru).

(17) Battersby, N. S. (1997). The ISO headspace CO_2 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby, N. S., Ciccognani, D., Evans, M. R., King, D., Painter, H.A., Peterson, D. R. in Starkey, M. (1999). An „inherent“ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

(20) Poglavje C.4 te priloge, Določanje „dobre“ biološke razgradljivosti.

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano in M. Takatsuki; CITI). Pariz.

(22) Poglavje C.11 te priloge, Preskus zaviranja dihanja aktivnega blata.

(23) Struijs, J., Stoltenkamp-Wouterse, M. J., in Dekkers, A. L. M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, maj 1999, Medmenham, SL7 2HD, Združeno kraljestvo.

(25) ISO 10634 (1996). Kakovost vode – Navodilo za pripravo in obdelavo v vodi slabo topnih organskih spojin za nadaljnje vrednotenje njihove biorazgradljivosti v vodi.

▼M4

Dodatek 1

OKRAJŠAVE IN OPREDELITEV POJMOV

IC: anorganski ogljik;

$ThCO_2$: teoretični ogljikov dioksid (mg) je količina ogljikovega dioksida, izračunana iz znane ali izmerjene vsebnosti ogljika v preskusni kemikaliji, ki se proizvede ob njeni popolni mineralizaciji; izražena tudi v mg ogljikovega dioksida, nastalega na mg preskusne kemikalije;

DOC: raztopljeni organski ogljik je organski ogljik, ki je prisoten v raztopini, ali gre skozi 0,45-mikrometrski filter, ali ostane v supernatantu po 15-minutnem centrifugiranju pri približno 4 000 g (40 000 m s^{-2});

DIC: raztopljeni anorganski ogljik;

ThIC: teoretični anorganski ogljik;

TIC: skupni anorganski ogljik;

dobro biološko razgradljivo: arbitrarna razvrstitev kemikalij, ki so uspešno opravile nekatere specifične presejalne preskuse za popolno biološko razgradljivost; ker so ti preskusi dovolj strogi, se predpostavlja, da se bodo take kemikalije v vodnem okolju in aerobnih pogojih hitro in povsem biološko razgradile;

10-dnevno obdobje: obdobje 10 dni, ki se začne takoj, ko je dosežena 10-odstotna biološka razgradnja;

inherentna biološka razgradljivost: razvrstitev snovi, za katere obstajajo nedvoumni dokazi biološke razgradljivosti (primarni ali popolni) iz katerega koli preskusa biološke razgradljivosti;

popolna aerobna biološka razgradnja: raven biološke razgradnje, ki je dosežena, ko mikroorganizmi povsem porabijo preskusno kemikalijo, pri čemer nastanejo ogljikov dioksid, voda, mineralne soli in nove mikrobne celične sestavine (biomasa);

mineralizacija: popolna razgradnja organske kemikalije v CO_2 in H_2O v aerobnih pogojih oziroma CH_4, CO_2 in H_2O v anaerobnih pogojih;

faza prilagajanja: čas, ki preteče od začetka preskusa do aklimatizacije in/ali prilagoditve razgradnih mikroorganizmov in do povišanja stopnje biološke razgradnje preskusne kemikalije ali organske snovi do zaznavne ravni (npr. 10 % največje teoretične biološke razgradnje ali manj, odvisno od točnosti merilne tehnike);

faza razgradnje: čas od konca obdobja prilagajanja do trenutka, ko se doseže 90 % najvišje ravni razgradnje;

faza konstantne ravni: faza, v kateri se doseže največja razgradnja, krivulja biološke razgradnje pa se zravna;

preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

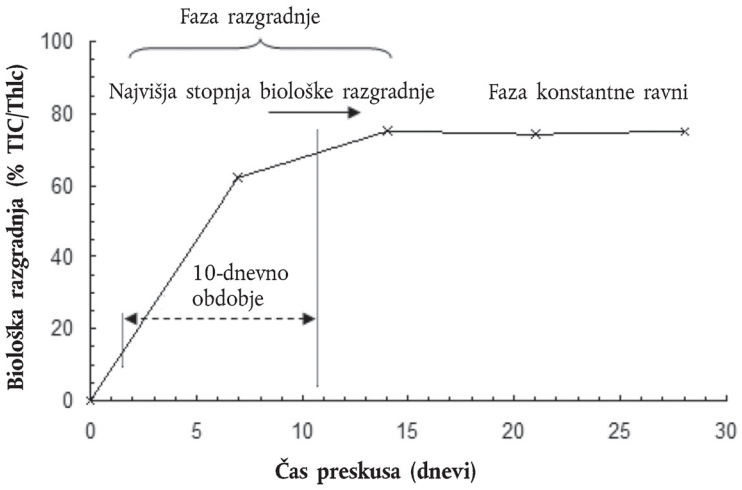
▼M4

Dodatek 2

Primer krivulje biološke razgradnje

Slika 1

Biološka razgradnja 1-oktanola v preskusu CO_2 v nadprostoru



Glosar:

Biološka razgradnja

Faza razgradnje

Najvišja stopnja biološke razgradnje

Faza konstantne ravni

10-dnevno obdobje

Čas preskusa (dnevi)

▼M4

C.30 BIOAKUMULACIJA V KOPENSKIH MALOŠČETINCIH

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 317 (2010). Med preskusnimi metodami, ki se nanašajo na okoljsko usodo, je bila leta 1996 objavljena Biokoncentracija: pretočni preskus na ribah (poglavje C.13 te priloge (49)), leta 2008 pa Bioakumulacija v bentoških maloščetincih, ki živijo v usedlinah (53). Ekstrapolacija podatkov o bioakumulaciji v vodnih organizmih na kopenske organizme, kot so deževniki, je zahtevna, če je sploh mogoča. Za ocenjevanje bioakumulacije kemikalij v tleh se trenutno uporabljajo modelni izračuni na podlagi lipofilnosti preskusne kemikalije, npr. (14) (37), kot na primer v tehničnih smernicah EU (19). Potreba po preskusni metodi za posamezna področja se je že začela obravnavati, npr. (55). Taka metoda je zlasti pomembna za ocenjevanje sekundarne zastrupitve v kopenskih prehranjevalnih verigah (4). Več nacionalnih preskusnih metod se ukvarja z vprašanjem bioakumulacije v organizmih, ki niso ribe, npr. (2) in (72). Ameriško združenje za preskušanje in materiale (American Society for Testing and Materials) je razvilo metodo za merjenje bioakumulacije v deževnikih (*Eisenia fetida*, Savigny) in enhitrejih iz kontaminiranih tal (3). Mednarodno priznana metoda za določanje bioakumulacije v tleh s primešano preskusno snovjo bo izboljšala ocenjevanje tveganja kemikalij v kopenskih ekosistemih, npr. (25) (29).

2. Nevretenčarji, ki jedo prst, so izpostavljeni kemikalijam v tleh. Med temi živalmi imajo kopenski maloščetinci pomembno vlogo pri strukturi in funkciji tal (15) (20). Živijo v tleh in delno ob površju (zlasti v plasti rastlinskega odpada); pogosto so najštevilnejša vrsta v biomasi (54). Z bioturbacijo tal in kot plen lahko te živali močno vplivajo na biološko razpoložljivost kemikalij za druge organizme, kot so nevretenčarji (npr. plenilske pršice in hrošči; npr. (64)) ali plenilski vretenčarji (npr. lisice in galebi) (18) (62). Nekatere vrste kopenskih maloščetincev, ki se trenutno uporabljajo pri ekotoksikološkem preskušanju, so opisane v Dodatku 5.

3. V Standardnih smernicah ASTM za izvajanje laboratorijskih preskusov strupenosti tal ali bioakumulacije z deževniki *Eisenia fetida* (*Lumbricidae*) in enhitrejev *Enchytraeus albidus* (*Enchytraeidae*) (3) so navedene številne bistvene in koristne podrobnosti za izvajanje te preskusne metode za bioakumulacijo v tleh. Nadaljnja dokumenta, ki sta navedena v tej preskusni metodi, sta poglavje C.13 te priloge Biokoncentracija: pretočni preskus na ribah (49) in Smernica za preskušanje OECD št. 315: Bioakumulacija v bentoških maloščetincih, ki živijo v usedlinah (53). Za to preskusno metodo so pomembni viri informacij tudi praktične izkušnje iz raziskav o bioakumulaciji v tleh in objave iz virov, npr. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Ta preskusna metoda se v glavnem uporablja za stabilne nevtralne organske kemikalije, ki se rade adsorbirajo na zemljino. S to preskusno metodo je mogoče preskušanje bioakumulacije stabilnih organokovinskih spojin, vezanih v tleh. Uporabi se lahko tudi za kovine in druge elemente v sledeh.

OSNOVNI POGOJ

5. Preskusi za merjenje bioakumulacije kemikalije v kopenskih maloščetincih se izvajajo s težkimi kovinami (glej npr. (63)) in obstojnimi organskimi kemikalijami z vrednostmi log K_{ow} med 3,0 in 6,0, npr. (40). Uporabljajo se tudi za:

— kemikalije, pri katerih je vrednost log K_{ow} večja od 6,0 (superhidrofobne kemikalije),

▼M4

— kemikalije, ki spadajo v razred organskih kemikalij, za katere je znano, da se lahko kopičijo v živih organizmih, npr. površinsko aktivne ali močno adsorptivne kemikalije,

— kemikalije, katerih strukturne značilnosti kažejo na možnost bioakumulacije, npr. analogi kemikalij z znanim bioakumulacijskim potencialom, in

— kovine.

6. Pred začetkom raziskave je treba pridobiti informacije o preskusni kemikaliji, kot so splošno ime, kemijsko ime (po možnosti ime IUPAC), strukturna formula, registrska številka CAS, čistost, varnostni ukrepi, ustrezni pogoji shranjevanja in analitske metode. Poleg tega bi bilo treba poznati naslednje podatke:

(a) topnost v vodi;

(b) koeficient porazdelitve oktanol/voda, K_{ow};

(c) koeficient porazdelitve zemljina/voda, izražen kot K_{oc};

(d) parni tlak;

(e) razgradljivost (npr. v tleh, vodi);

(f) znani metaboliti.

7. Uporabiti je mogoče tudi radioaktivno označene in neoznačene preskusne kemikalije. Za lažjo analizo se priporoča uporaba radioaktivno označene preskusne kemikalije. Odločitev se sprejme na podlagi meja zaznavnosti ali zahteve glede merjenja matične preskusne kemikalije in metabolitov. Če se uporabi radioaktivno označena preskusna kemikalija in merijo skupni radioaktivni ostanki, je pomembno, da se radioaktivno označeni ostanki v tleh in preskusnih organizmih opredelijo glede deležev matične preskusne kemikalije in tiste, ki je označena za nematično, npr. v vzorcih, vzetih v stabilnem stanju ali ob koncu faze absorpcije, da je mogoče izračunati bioakumulacijski faktor (BAF) za matično preskusno kemikalijo in zadevne metabolite v tleh (glej odstavek 50). Za merjenje radioaktivno neoznačenih organskih preskusnih kemikalij ali kovin je tu opisano metodo morda treba prilagoditi, npr. za zagotovitev zadostne biomase. Pri merjenju skupnih radioaktivnih ostankov (s tekočinskim scintilacijskim štetjem po ekstrakciji, sežigu ali omogočitvi topnosti tkiva) bioakumulacijski faktor temelji na matični preskusni kemikaliji in metabolitih. Izračun BAF mora po možnosti temeljiti na koncentraciji matične preskusne kemikalije v organizmih in skupnih radioaktivnih ostankov. Nato je treba za primerljivost rezultatov iz različnih preskusov bioakumulacije iz BAF izračunati faktor akumulacije v organizmih glede na tla (BSAF), normaliziran na vsebnost lipidov v črvih in vsebnost organskega ogljika (OC) v tleh.

8. Znana mora biti strupenost preskusne kemikalije za vrsto, uporabljeno v preskusu, npr. koncentracija z učinkom (ECx) ali smrtna koncentracija (LCx) v fazi absorpcije (npr. (19)). Izbrana koncentracija preskusne kemikalije mora biti po možnosti približno 1 % njenega akutnega asimptotičnega LC_{50} in vsaj desetkrat višja kot meja njenega zaznavanja v tleh z uporabljeno analitsko metodo. Prednost je treba dati vrednostim strupenosti, ki izhajajo iz dolgotrajnih raziskav subletalnih končnih točk, če so na voljo (51) (52). Če taki podatki niso na voljo, je koristne informacije mogoče dobiti s preskusom akutne strupenosti (glej npr. (23)).

▼M4

9. Na voljo mora biti ustrezna analitska metoda znane točnosti, natančnosti in občutljivosti za količinsko opredelitev kemikalije v preskusnih raztopinah, tleh in biološkem materialu, pa tudi podrobnosti o pripravi in shranjevanju vzorcev ter varnostni listi za snov. Znane morajo biti tudi analitske meje zaznavnosti preskusne snovi v tleh in tkivu črvov. Pri uporabi preskusne kemikalije, označene s ^{14}C, je treba poznati specifično radioaktivnost (tj. Bq mol-1) in delež radioaktivnosti, povezan z nečistotami. Specifična radioaktivnost preskusne kemikalije mora biti dovolj visoka, da omogoča analizo, uporabljene preskusne koncentracije pa ne smejo sprožiti strupenih učinkov.

10. Preskus se lahko izvaja z umetnimi ali naravnimi zemljinami. Pred začetkom preskusa je treba poznati informacije o značilnostih uporabljene naravne zemljine, npr. izvor zemljine ali njenih sestavin, pH, vsebnost organskega ogljika, velikostno porazdelitev delcev (delež peska, mulja in gline) in zmogljivost zadrževanja vode (WHC) (3) (48).

NAČELO PRESKUSA

11. Med parametri, ki so značilni za bioakumulacijo preskusne kemikalije, so bioakumulacijski faktor (BAF), konstanta hitrosti absorpcije (k_s) in konstanta hitrosti izločanja (k_e). Opredelitve so navedene v Dodatku 1.

12. Preskus sestavljata dve fazi: faza absorpcije (izpostavljenosti) in faza izločanja (po izpostavljenosti). V fazi absorpcije so ponovitvene skupine črvov izpostavljene zemljini, ki ji je dodana preskusna kemikalija. Poleg preskusnih živali so v enakih pogojih kontrolne skupine črvov, le brez preskusne kemikalije. Izmerita se suha teža preskusnih organizmov in vsebnost lipidov v njih. Pri tem je mogoče uporabiti črve iz kontrolne skupine. Analitske vrednosti ozadja (slepi vzorec) je mogoče dobiti z analizo kontrolnih vzorcev črvov in tal. Za fazo izločanja se črvi prenesejo v tla, v katerih ni preskusne kemikalije. Faza izločanja je vedno potrebna, razen če je absorpcija preskusne kemikalije v fazi izpostavljenosti zanemarljiva. Faza izločanja zagotavlja informacije o hitrosti, s katero se preskusna kemikalija izloča iz preskusnih organizmov (npr. (27)). Če v fazi absorpcije stabilno stanje ni doseženo, mora določitev kinetičnih parametrov – kinetičnega bioakumulacijskega faktorja BAFk, konstante hitrosti absorpcije in konstante hitrosti izločanja – po možnosti temeljiti na hkratnem prilagajanju rezultatov iz faze absorpcije in faze izločanja. Koncentracija preskusne kemikalije v/na črvih se spremlja ves čas trajanja obeh faz preskusa.

13. V fazi absorpcije se meritve opravljajo ob časih vzorčenja do največ 14 dni (enhitreji) oziroma 21 dni (deževniki), dokler ni doseženo stabilno stanje (11) (12) (67). Stabilno stanje je vzpostavljeno, ko je krivulja koncentracije v črvih v odvisnosti od časa vzporedna s časovno osjo in se tri zaporedne analize koncentracije vzorcev, vzetih v vsaj dvodnevnih intervalih, med seboj ne razlikujejo za več kot ± 20 % glede na statistične primerjave (npr. analiza variance, regresijska analiza).

14. V fazi izločanja se preskusni organizmi prenesejo v posode z istim substratom brez preskusne kemikalije. V fazi izločanja se meritve opravljajo 14 dni (enhitreji) oziroma 21 dni (deževniki) ob časih vzorčenja, razen če je prejšnje analitsko določanje pokazalo 90-odstotno zmanjšanje ostankov preskusne kemikalije v črvih. O koncentraciji preskusne kemikalije v črvih ob koncu faze izločanja se poroča kot o neizločenih ostankih. Bioakumulacijski faktor stabilnega stanja (BAFss) se izračuna po možnosti kot razmerje

▼M4

med koncentracijo v črvih (ca) in tleh (Cs) v očitnem stabilnem stanju ter kot kinetični bioakumulacijski faktor (BAFK) oziroma razmerje med konstanto hitrosti absorpcije iz tal (ks) in konstanto hitrosti izločanja (ke) (za opredelitve glej Dodatek 1) ob predpostavki kinetike prvega reda (za izračune glej Dodatek 2). Če kinetika prvega reda očitno ni ustrezna, je treba uporabiti druge modele.

15. Konstanta hitrosti absorpcije, konstanta hitrosti izločanja (ali konstante pri uporabi drugih modelov), kinetični bioakumulacijski faktor (BAFK), in kjer je to mogoče, intervali zaupanja za vse te parametre se izračunajo po računalniških modelnih enačbah (za navodila glej Dodatek 2). Ustreznost prileganja modela je mogoče ugotoviti na primer na podlagi korelacijskega koeficienta ali determinacijskega koeficienta (koeficienti blizu ena pomenijo dobro prileganje) ali hi-kvadrata. Kažeta jo lahko tudi velikost standardne napake ali interval zaupanja za ocenjene parametre.

16. Za zmanjšanje variabilnosti rezultatov preskusa za preskusne kemikalije z visoko lipofilnostjo je treba bioakumulacijske faktorje izraziti v odvisnosti od vsebnosti lipidov in vsebnosti organskega ogljika (vsebnost organskega ogljika (OC) v kg zemljine, vsebnost lipidov v kg-1 črvov). Ta pristop temelji na dejstvu, da pri nekaterih razredih kemikalij obstaja jasna povezanost med potencialom bioakumulacije in lipofilnostjo; to je že dobro dokazano pri ribah (47). Obstaja povezanost med vsebnostjo lipidov v ribah in bioakumulacijo takih kemikalij. Podobna medsebojna odvisno je bila ugotovljena pri bentoških organizmih, npr. (30) (44), dokazana pa je tudi za kopenske maloščetince, npr. (5) (6) (7) (14). Če je na voljo dovolj črvjega tkiva, je mogoče vsebnost lipidov v preskusnih živalih določiti z uporabo istega biološkega materiala kot za določanje koncentracije preskusne kemikalije. Sicer se lahko za meritev vsebnosti lipidov uporabijo kontrolne živali.

VELJAVNOST PRESKUSA

17. Da je preskus veljaven, morajo kontrolni in tretirani vzorci izpolnjevati naslednja merila:

— ob koncu preskusa skupna smrtnost v fazah absorpcije in izločanja ne sme presegati 10 % (deževniki) oziroma 20 % (enhitreji) skupnega števila uporabljenih črvov,

— pri *Eisenia fetida* in *Eisenia andrei* srednja izguba teže, merjena ob koncu faze absorpcije in ob koncu faze izločanja, ne sme presegati 20 % v primerjavi z začetno svežo težo (f.w.) na začetku posamezne faze.

OPIS METODE

Preskusne vrste

18. Za preskušanje bioakumulacije je priporočenih več vrst kopenskih maloščetincev. Največkrat uporabljene vrste *Eisenia fetida,* ali *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*), ali *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus,* ali *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*) so opisane v Dodatku 5.

▼M4

Oprema

19. Pri vseh delih opreme se je treba izogibati uporabi materialov, ki se lahko raztopijo, adsorbirajo preskusno kemikalijo ali iz katerih se lahko izlužijo druge kemikalije in ki škodljivo učinkujejo na preskusne živali. Uporabiti je mogoče standardne pravokotne ali valjaste posode iz kemijsko inertne snovi in s primerno prostornino, ki ustrezajo stopnji obremenitve, tj. številu preskusnih črvov. Za opremo, ki je v stiku s preskusnimi mediji, se lahko uporabijo nerjavno jeklo, plastika ali steklo. Preskusne posode je treba ustrezno pokriti, da se prepreči uhajanje črvov, hkrati pa omogoči zadosten dotok zraka. Pri kemikalijah z visokimi adsorpcijskimi koeficienti, kot so sintetični piretroidi, je lahko potrebno silanizirano steklo. V teh primerih je treba opremo po uporabi zavreči (49). Preprečiti je treba uhajanje radioaktivno označenih preskusnih snovi in hlapnih kemikalij. Uporabiti je treba lovilnike (npr. steklene plinske izpiralke), ki vsebujejo ustrezne absorbente za zadrževanje morebitnih ostankov, ki izparijo iz preskusnih posod.

Tla

20. Tla morajo biti take kakovosti, ki omogoča preživetje in po možnosti razmnoževanje preskusnih organizmov med aklimatizacijo in preskušanjem, ne da bi bili pri tem videti nenormalno ali bi se nenormalno obnašali. Črvi se morajo zariti v tla.

21. Umetna zemljina, opisana v poglavju C.8 te priloge (48), je priporočena za uporabo kot substrat v preskusih. V Dodatku 4 so podani opis priprave umetne zemljine za uporabo pri preskusu bioakumulacije in priporočila za shranjevanje umetne zemljine. Na zraku posušena umetna zemljina se lahko do uporabe hrani pri sobni temperaturi.

22. Za preskusna tla in/ali tla za gojenje je mogoče uporabiti tudi naravno zemljino z neonesnaženih območij. Pri naravni zemljini je treba opredeliti vsaj izvor (mesto odvzema), pH, vsebnost organskega ogljika, velikostno porazdelitev delcev (delež peska, mulja in gline), največjo zmogljivost zadrževanja vode (WHCmax) in delež vsebnosti vode (3). Analiza tal ali njihovih sestavin, kar zadeva mikro onesnaževala, pred uporabo bi morala dati koristne informacije. Če se uporabi zemljina s kmetijskih zemljišč, se že vsaj eno leto pred vzorčenjem ne smejo obdelovati z izdelki za zaščito pridelka ali gnojem tretiranih živali kot gnojili, z organskimi gnojili pa že vsaj šest mesecev pred vzorčenjem (50). Postopki ravnanja z naravno zemljino pred uporabo v ekotoksikoloških preskusih z maloščetinci v laboratoriju so opisani v (3). Pri naravni zemljini mora biti čas shranjevanja v laboratoriju čim krajši.

Uporaba preskusne kemikalije

23. Preskusna kemikalija se vnese v tla. Pri tem je treba upoštevati njene fizikalno-kemijske lastnosti. Preskusno kemikalijo, ki se topi v vodi, je treba pred mešanjem z zemljino povsem raztopiti v vodi. Priporočeni postopek dodajanja preskusnih kemikalij, ki se slabo topijo v vodi, vključuje prekrivanje ene ali več sestavin (umetne) zemljine s preskusno kemikalijo. Kremenov pesek ali del kremenovega peska je mogoče na primer namočiti v raztopini preskusne kemikalije v primernem organskem topilu ter jo nato počasi izpariti do suhega. Prekriti del se lahko nato vmeša v vlažna tla. Velika prednost tega postopka je, da se v tla ne vnese topilo. Pri uporabi

▼M4

naravne zemljine je mogoče preskusno kemikalijo dodati s primešanjem k delu na zraku posušene zemljine, kot je opisano zgoraj za umetno zemljino, ali z vmešanjem preskusne kemikalije v vlažno zemljino, z naknadnim izparevanjem, če je uporabljeno topilo. Na splošno se je treba čim bolj izogibati stiku vlažne zemljine s topili. Treba je upoštevati naslednje (3):

— če se uporabi topilo, ki ni voda, mora biti tako, da se lahko meša z vodo in/ali da ga je mogoče odstraniti (na primer upariti), tako da v tleh ostane samo preskusna kemikalija,

— če se uporabi kontrolni vzorec s topilom, negativna kontrola ni potrebna. Kontrolni vzorec s topilom mora vsebovati največjo koncentracijo topila, dodano zemljini, uporabiti pa je treba topilo iz iste šarže kot za osnovno raztopino. Strupenost in hlapnost topila ter topnost preskusne kemikalije v izbranem topilu bi morale biti glavna merila za izbiro primernega topila.

24. Pri kemikalijah, ki so slabo topne v vodi in organskih topilih, je mogoče 2,0–2,5 g drobno mletega kremenovega peska na preskusno posodo zmešati z določeno količino preskusne kemikalije, npr. s terilnico in pestilom, da nastane želena preskusna koncentracija. Ta mešanica kremenovega peska in preskusne kemikalije se lahko doda predhodno navlaženi zemljini in temeljito zmeša z ustrezno količino deionizirane vode, da nastane potrebna vsebnost vlage. Končna mešanica se porazdeli v preskusne posode. Postopek se ponovi za vsako preskusno koncentracijo in pripravi tudi ustrezni kontrolni vzorec z 2,0–2,5 g drobno mletega kremenovega peska na preskusno posodo.

25. Koncentracijo preskusne kemikalije v tleh je treba določiti po primešanju. Pred uvedbo preskusnih organizmov je treba preveriti homogeno porazdelitev preskusne kemikalije v tleh. Poročati je treba o metodi, uporabljeni za primešanje, in razlogih za izbiro posebnega postopka primešanja (24).

26. Idealno je, če se pred dodajanjem organizmov vzpostavi ravnotežje med zemljino in fazo porne vode; priporočeno je štiridnevno obdobje pri 20 °C. Pri številnih organskih kemikalijah, ki so slabo topne v vodi, se lahko čas, potreben za vzpostavitev resničnega ravnotežja med adsorbiranimi in raztopljenimi delci, šteje v dnevih ali mesecih. Glede na namen raziskave, na primer pri posnemanju razmer v okolju, se lahko zemljina s primešano preskusno snovjo „stara“ dlje, npr. pri kovinah tri tedne pri 20 °C (22).

Gojenje preskusnih organizmov

27. Črvi se po možnosti gojijo v trajni laboratorijski kulturi. Navodila o metodah laboratorijskega gojenja za vrste *Eisenia fetida* in *Eisenia andrei* ter *Enchytraeid* so podana v Dodatku 5 (glej tudi (48) (51) (52)).

28. Črvi, uporabljeni v preskusih, morajo biti brez ugotovljivih bolezni, bolezenskih sprememb in zajedavcev.

IZVEDBA PRESKUSA

29. Preskusni organizmi so preskusni kemikaliji izpostavljeni v fazi absorpcije. Ta mora trajati 14 dni (enhitreji) oziroma 21 dni (deževniki), razen če se dokaže, da je bilo vzpostavljeno stabilno stanje.

▼M4

30. Za fazo izločanja se črvi prenesejo v tla, v katerih ni preskusne kemikalije. Prvi vzorec je treba vzeti 4–24 h po začetku faze izločanja. Primeri časovnih razporedov vzorčenja za 21-dnevno fazo absorpcije in 21-dnevno fazo izločanja so podani v Dodatku 3.

Preskusni organizmi

31. Pri številnih vrstah kopenskih enhitrejev je teža posameznih osebkov zelo majhna (npr. 5–10 mg mokre teže na posamezno žival vrste *Enchytraeus albidus* in manj pri vrstah *Enchytraeus crypticus* ali *Enchytraeus luxuriosus*); za meritev teže in kemično analizo je včasih treba združevati črve iz ponovitvenih preskusnih posod (tj. uporabijo se vsi črvi iz ponovitvene posode, da se dobi en analitski rezultat za tkivo). Vsaki ponovitvi se doda 20 posameznih enhitrejev, uporabiti pa je treba vsaj tri ponovitve. Če je analitska meja zaznavnosti preskusne kemikalije visoka, je lahko potrebnih več črvov. Pri preskusnih vrstah z večjo težo posameznega osebka (*Eisenia fetida* in *Eisenia andrei*) je mogoče uporabiti ponovitvene posode z enim osebkom.

32. Deževniki, uporabljeni v preskusu, morajo imeti podobno težo (npr. posamezne živali vrst *Eisenia fetida* in *Eisenia andrei* bi morale tehtati 250–600 mg). Enhitreji (npr. *Enchytraeus albidus*) morajo biti dolgi približno 1 cm. Vsi črvi, uporabljeni v posameznem preskusu, morajo biti iz istega vira in biti odrasle živali s klitelumom (glej Dodatek 5). Ker lahko teža in starost živali vplivata na vrednosti BAF (npr. zaradi različnih vsebnosti lipidov in/ali prisotnosti jajčec), je treba te parametre natančno zapisovati in jih upoštevati pri razlagi rezultatov. Poleg tega lahko živali v obdobju izpostavljenosti odložijo kokone, kar tudi vpliva na vrednosti BAF. Priporočeno je pred preskusom stehtati podvzorec preskusnih črvov, da se ocenita srednja mokra in suha teža.

33. Uporabiti je treba visoko razmerje med zemljino in črvi, da se v fazi absorpcije čim bolj zmanjša zniževanje koncentracije preskusne kemikalije v tleh. Za vrsti *Eisenia fetida* in *Eisenia andrei* je priporočenih najmanj 50 g suhe teže (d.w.) zemljine na črva, za enhitreje pa najmanj 10–20 g d.w. zemljine na preskusno posodo. Posode morajo vsebovati 2–3-centimetrski (enhitreji) oziroma 4–5-centimetrsko plast zemljine (deževniki).

34. Črvi, uporabljeni v preskusu, se odstranijo iz gojišča (npr. enhitreji se odstranijo s pinceto z zaobljeno konico). Odrasle živali se prestavijo v neobdelana preskusna tla za aklimatizacijo in nahranijo (glej odstavek 36). Če se preskusni pogoji razlikujejo od pogojev gojenja, bi morala aklimatizacijska faza, ki traja 24–72 h, zadostovati za prilagoditev črvov na preskusne pogoje. Po aklimatizaciji se deževniki s premestitvijo sperejo v steklene posode (npr. petrijevke), ki vsebujejo čisto vodo, nato pa se stehtajo, preden se dodajo v preskusna tla. Pred tehtanjem je treba odstraniti odvečno vodo s črvov tako, da se nežno pritisnejo ob rob posode ali pa se voda previdno popivna z njih z rahlo navlaženo papirnato brisačo.

35. Opazovati in zapisovati je treba obnašanje preskusnih organizmov v zvezi z zarivanjem. Pri preskusih z deževniki se živali (kontrolni in tretirani vzorci) običajno zarijejo v tla v nekaj urah; to je treba preveriti najpozneje 24 h po tem, ko se črvi dajo v preskusne posode. Če se deževniki ne zarijejo v tla (npr. več kot 10 % v več kot polovici faze absorpcije), to pomeni, da

▼M4

preskusni pogoji niso ustrezni ali da preskusni organizmi niso zdravi. V takem primeru je treba preskus ustaviti in ponoviti. Enhitreji večinoma živijo v intersticijskih porah v tleh, njihov integument pa je pogosto samo delno v stiku s substratom v okolju; izpostavljenost enhitrejev, ki se zarijejo v tla, in tistih, ki se ne, se šteje za enakovredno, če se enhitreji ne zarijejo v tla, pa to ne pomeni nujno, da je treba preskus ponoviti.

Hranjenje

36. Pri uporabi zemljine z majhno vsebnostjo skupnega organskega ogljika je treba predvideti hranjenje. Pri uporabi umetne zemljine je za deževnike priporočena tedenska količina hrane (črvi naj se hranijo enkrat tedensko), ki znaša 7 mg posušenih iztrebkov na g suhe teže zemljine, za enhitreje pa tedenska količina 2–2,5 mg mletih ovsenih kosmičev na g suhe teže zemljine (11). Prvi obrok hrane je treba primešati v zemljino tik pred dodajanjem preskusnih organizmov. Po možnosti se uporabi ista vrsta hrane kot v gojiščih (glej Dodatek 5).

Svetloba in temperatura

37. Preskuse je treba izvajati v kontroliranem ciklusu 16 ur svetlobe in 8 ur teme, po možnosti pri 400–800 lux na mestu s preskusnimi posodami (3). Preskusna temperatura mora biti ves čas preskusa 20 ± 2 °C.

Preskusne koncentracije

38. Uporabi se samo ena koncentracija. Uporabo dodatnih koncentracij je treba utemeljiti. Če je strupenost (ECx) preskusne kemikalije blizu analitski meji zaznavnosti, je priporočena uporaba radioaktivno označene preskusne kemikalije z visoko specifično radioaktivnostjo. Pri kovinah mora biti koncentracija nad ravnjo ozadja v tkivu in tleh.

Ponovitve

39. Za kinetične meritve (fazi absorpcije in izločanja) morajo biti najmanj tri ponovitvene posode s tretiranim vzorcem na točko vzorčenja. Skupno število pripravljenih ponovitev mora zadostovati za vse čase vzorčenja v fazi absorpcije in fazi izločanja.

40. Za biološka opazovanja in meritve (npr. razmerje med suho in mokro težo, vsebnost lipidov) ter analizo koncentracij ozadja v črvih in tleh je treba zagotoviti vsaj 12 ponovitvenih posod z negativnim kontrolnim vzorcem (štiri, vzorčene na začetku, štiri na koncu absorpcije in štiri na koncu izločanja), če se ne uporablja drugo topilo kot voda. Če se za dodajanje preskusne kemikalije uporabi drugo topilo, je treba poleg tretiranih ponovitev pripraviti tudi kontrolni vzorec s topilom (štiri ponovitvene posode je treba vzorčiti na začetku, štiri na koncu faze absorpcije in štiri na koncu faze izločanja), ki vsebuje vse sestavine, razen preskusne snovi. V tem primeru je mogoče uporabiti tudi štiri dodatne ponovitvene posode z negativnim kontrolnim vzorcem (brez topila) za neobvezno vzorčenje na koncu faze absorpcije. Te ponovitve je mogoče biološko primerjati s kontrolnim vzorcem s topilom, da se dobijo informacije o morebitnem vplivu topila na preskusne organizme. Priporočeno je pripraviti zadostno število dodatnih rezervnih ponovitvenih posod (npr. osem) za tretirane in kontrolne vzorce.

▼M4

Pogostost meritev kakovosti tal

41. Na začetku in koncu faz absorpcije in izločanja je treba izmeriti vrednost pH tal, vsebnost vlage v tleh in temperaturo (stalno) v sobi, v kateri se izvaja preskus. Enkrat tedensko je treba preveriti vsebnost vlage v tleh s tehtanjem preskusnih posod in primerjanjem dejanskih tež z začetnimi težami na začetku preskusa. Izgubo vode je treba nadomestiti z dodajanjem deionizirane vode.

Vzorčenje in analiza črvov in tal

42. Primer časovne razporeditve faz absorpcije in izločanja v preskusih bioakumulacije v deževnikih in enhitrejih je podan v Dodatku 3.

43. Vzorci tal se odvzamejo iz preskusnih posod za določitev koncentracije preskusne kemikalije pred vnosom črvov ter v fazah absorpcije in izločanja. Med preskusom se določajo koncentracije preskusne kemikalije v črvih in tleh. Na splošno se merijo skupne koncentracije v tleh. Mogoče je meriti tudi koncentracije v porni vodi; v takem primeru je treba pred začetkom raziskave podati razloge za to in zagotoviti ustrezne metode ter jih vključiti v poročilo.

44. Črvi in tla se vzorčijo vsaj šestkrat v fazah absorpcije in izločanja. Če se dokaže stabilnost preskusne kemikalije, je lahko analiz tal manj. Priporočeno je analizirati vsaj tri ponovitve na začetku in koncu faze absorpcije. Če koncentracija v tleh, izmerjena na koncu faze absorpcije, odstopa od začetne koncentracije za več kot za 30 %, je treba analizirati tudi vzorce tal, vzete v drugih dneh.

45. Ob vsakem času vzorčenja se črvi iz ponovitve odstranijo iz tal (npr. ko se zemljina iz ponovitve razporedi na plitev pladenj, se črvi poberejo z mehko pinceto z zaobljeno konico) in na hitro sperejo z vodo v plitvem steklenem ali jeklenem pladnju. Odvečna voda se odstrani (glej odstavek 34). Črvi se pazljivo premestijo v predhodno stehtano posodo in takoj stehtajo, vključno z vsebino prebavil.

46. Deževnikom (*Eisenia* sp.) je nato treba omogočiti, da čez noč praznijo prebavila, npr. na vlažnem filtrirnem papirju v pokriti petrijevki (glej odstavek 34). Po tem je treba določiti težo črvov, da se oceni morebitno zmanjšanje biomase med preskusom (glej merila veljavnosti v odstavku 17). Tkiva enhitrejev se tehtajo in analizirajo brez praznjenja prebavil, saj je to tehnično zahtevno, ker so ti črvi tako majhni. Po določitvi končne teže jih je treba takoj ubiti z najprimernejšo metodo (npr. s tekočim dušikom ali zamrznjenjem pri temperaturi pod –18 °C).

47. Črvi v fazi izločanja nadomestijo kontaminirano vsebino prebavil s čisto zemljino. To pomeni, da meritve pri črvih z neizpraznjenimi prebavili (v tem primeru enhitrejih), vzorčenih tik pred fazo izločanja, vključujejo kontaminirano zemljino v prebavilih. Pri vodnih maloščetincih se predpostavlja, da se po začetnih 4–24 h faze izločanja večina kontaminirane vsebine prebavil nadomesti s čistim sedimentom, npr. (46). O podobnih ugotovitvah se je poročalo v zvezi z deževniki v raziskavah o kopičenju radioaktivno označenega kadmija in cinka (78). Pri enhitrejih z neizpraznjenimi prebavili se lahko koncentracija tega prvega vzorca v fazi izločanja šteje za koncentracijo v tkivu po praznjenju prebavil. Da bi upoštevali razredčenje koncentracije preskusne snovi z nekontaminirano zemljino v fazi izločanja, je mogoče oceniti težo vsebnosti prebavil iz razmerja med mokro težo črvov in težo pepela črvov ali razmerja med suho težo črvov in težo pepela črvov.

▼M4

48. Vzorci tal in črvov se po možnosti analizirajo takoj po odstranitvi (tj. v 1–2 dneh), da se preprečijo razgradnja ali druge izgube. Priporočljivo je že med izvajanjem preskusa izračunati približne hitrosti absorpcije in izločanja. Če se analiza odloži, je treba vzorce ustrezno shraniti, npr. z globokim zamrzovanjem (≤ –18 °C).

49. Preveriti je treba, ali so natančnost in ponovljivost kemijske analize ter rekuperacija preskusne kemikalije iz vzorcev tal in črvov zadovoljivi za zadevno metodo; poročati je treba o učinkovitosti ekstrakcije, meji zaznavnosti (LOD) in meji količinske opredelitve (LOQ). Poleg tega je treba preveriti, da preskusna kemikalija v kontrolnih posodah ni zaznavna v koncentracijah, ki so višje kot v ozadju. Če je pri kontrolnih črvih koncentracija preskusne kemikalije v preskusnem organizmu Ca > 0, je to treba vključiti v izračun kinetičnih parametrov (glej Dodatek 2). V celotnem preskusu je treba z vsemi vzorci ravnati tako, da se kontaminacija in izguba čim bolj zmanjšata (npr. zaradi adsorpcije preskusne kemikalije na napravo za vzorčenje).

50. Pri delu z radioaktivno označenimi preskusnimi kemikalijami je mogoče analizirati matične snovi in metabolite. Količinska opredelitev matične preskusne kemikalije in metabolitov v stabilnem stanju ali na koncu faze absorpcije vsebuje pomembne informacije. Vzorce je nato treba „očistiti“, da je mogoče matično preskusno kemikalijo količinsko ločeno opredeliti. Če posamezni metaboliti presegajo 10 % skupne radioaktivnosti v analiziranih vzorcih, se priporoča identifikacija teh metabolitov.

51. Navesti je treba skupno rekuperacijo ter rekuperacijo preskusne kemikalije v črvih, tleh in lovilnikih, ki vsebujejo absorbente za zadrževanje uparjene preskusne kemikalije, če se uporabijo, in poročati o njiju.

52. Združevanje posameznih vzorčenih živali iz dane preskusne posode je sprejemljivo pri enhitrejih, ki so manjši od deževnikov. Če združevanje vključuje zmanjševanje števila ponovitev, to omejuje statistične postopke, ki jih je mogoče uporabiti za podatke. Če sta potrebna posebna statistični postopek in vrednost, je treba v preskus vključiti primerno število ponovitvenih preskusnih posod za prilagoditev želenemu združevanju, postopku in vrednosti.

53. Priporoča se, naj se BAF izrazi v odvisnosti od skupne suhe teže, in kadar je to potrebno (tj. pri močno hidrofobnih kemikalijah), v odvisnosti od vsebnosti lipidov. Za določanje vsebnosti lipidov je treba uporabiti primerne metode (za ta namen je treba prilagoditi nekatere obstoječe metode, npr. (31) (58)), pri katerih se uporablja tehnika ekstrakcije s kloroformom/metanolom. Da bi se izognili uporabi kloriranih topil, pa je treba uporabiti prilagojeno metodo Bligha in Dyerja (9), kot je opisana v (17). Ker različne metode ne dajo nujno enakih vrednosti, je pomembno navesti podrobnosti o uporabljeni metodi. Kadar je to mogoče, tj. če je na voljo dovolj črvjega tkiva, je analizo lipidov najbolje opraviti na istem vzorcu ali ekstraktu, na katerem je bila analizirana preskusna kemikalija, ker je treba lipide pogosto odstraniti iz ekstrakta, preden ga je mogoče kromatografsko analizirati (49). Sicer je mogoče za merjenje vsebnosti lipidov uporabiti kontrolne živali, kar je mogoče nato uporabiti za normalizacijo vrednosti BAF. Pri slednjem pristopu se zmanjša kontaminacija opreme s preskusno kemikalijo.

▼M4

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

54. Krivulja absorpcije preskusne kemikalije se dobi tako, da se njena koncentracija v/na črvih v fazi absorpcije grafično prikaže v odvisnosti od časa na aritmetični lestvici. Ko krivulja doseže konstantno raven ali stabilno stanje (glej opredelitve v Dodatku 1), se bioakumulacijski faktor stabilnega stanja BAFss izračuna iz:

$$\frac{C_a \text{ v stabilnem stanju ali na koncu faze absorpcije (srednja vrednost)}}{C_s \text{ v stabilnem stanju ali na koncu faze absorpcije (srednja vrednost)}}$$

C_a je koncentracija preskusne kemikalije v preskusnem organizmu,

C_s je koncentracija preskusne kemikalije v tleh.

55. Kadar stabilno stanje ni doseženo, je treba namesto BAFss določiti BAFK na podlagi konstant hitrosti, kot je opisano spodaj:

— akumulacijski faktor (BAF_K) se določi kot razmerje med k_s in k_e,

— hitrosti absorpcije in izločanja se po možnosti izračunata hkrati (glej enačbo 11 v Dodatku 2),

— konstanta hitrosti izločanja (k_e) se običajno določi na podlagi krivulje izločanja (tj. grafičnega prikaza koncentracije preskusne snovi v črvih v fazi izločanja). Konstanta hitrosti absorpcije k_s se nato izračuna iz k_e in vrednosti C_a, ki se dobi iz krivulje absorpcije – za opis teh metod glej Dodatek 2. Za izračun faktorja BAF_K in konstant hitrosti k_s in k_e je najbolje uporabiti računalniške metode za ocenjevanje nelinearnih parametrov. Če izločanje očitno ni prvega reda, je treba uporabiti kompleksnejše modele.

Poročilo o preskusu

56. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— vse razpoložljive informacije o akutni ali dolgotrajni strupenosti (npr. EC_x, LC_x“ NOEC) preskusne kemikalije za maloščetince, ki živijo v tleh,

— čistost, fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti, npr. log K_{ow}, vodotopnost,

— kemijski identifikacijski podatki, vir preskusne snovi, identiteta in koncentracija uporabljenega topila,

— če je uporabljena radioaktivno označena preskusna kemikalija, točen položaj označenih atomov, specifična radioaktivnost in radiokemijska čistost.

Preskusna vrsta:

— znanstveno ime, sev, vir, morebitna predobdelava, aklimatizacija, starost, red velikosti itd.

▼M4

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek,

— tip in lastnosti uporabljene svetlobe in obdobja osvetljenosti,

— načrt preskusa (npr. število in velikost preskusnih posod, teža zemljine in debelina plasti tal, število ponovitev, število črvov na ponovitev, število preskusnih koncentracij, trajanje faz absorpcije in izločanja, pogostost vzorčenja),

— razlogi za izbiro materiala, iz katerega so preskusne posode,

— metoda priprave in dodajanja preskusne snovi ter razlogi za izbiro metode,

— nazivne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, s katero so bile te vrednosti pridobljene,

— vir sestavin umetne zemljine ali – pri uporabi naravnih medijev – izvor zemljine, opis morebitne predobdelave, rezultati kontrol (preživetje, razvoj biomase, razmnoževanje), lastnosti tal (pH, vsebnost skupnega organskega ogljika, velikostna porazdelitev delcev (odstotni delež peska, mulja in gline), WHC_{max}, odstotni delež vsebnosti vode na začetku in koncu preskusa ter druge opravljene meritve),

— podrobne informacije o obdelavi vzorcev tal in črvov, vključno s podrobnostmi o pripravi, shranjevanju, postopkih dodajanja snovi, ekstrakciji in analitskih postopkih (in natančnosti) za preskusno snov v črvih in tleh ter o vsebnosti lipidov (če je bila izmerjena) in rekuperaciji preskusne snovi.

Rezultati:

— smrtnost kontrolnih črvov in črvov v vsaki preskusni posodi ter opaženo nenormalno obnašanje (npr. izogibanje tlom, slabo razmnoževanje pri preskusu bioakumulacije v enhitrejih),

— razmerje med suho in mokro težo zemljine in preskusnih organizmov (koristno za normalizacijo),

— mokre teže črvov ob vsakem času vzorčenja; za deževnike mokre teže na začetku preskusa ter ob vsakem času vzorčenja pred praznjenjem prebavil in po njem,

— vsebnost lipidov v preskusnih organizmih (če je bila določena),

— krivulje, ki prikazujejo kinetiko absorpcije in izločanja preskusne kemikalije pri črvih ter čas do vzpostavitve stabilnega stanja,

— C_a in C_s (s standardnim odklonom in razponom, če je ustrezno) za vse čase vzorčenja (C_a izražen v $g \cdot kg^{-1}$ mokre in suhe teže celega telesa, C_s izražen v $g \cdot kg^{-1}$ mokre in suhe teže zemljine). Če je potreben faktor akumulacije v organizmih glede na tla (BSAF) (npr. za primerjavo rezultatov dveh ali več preskusov, opravljenih z živalmi z različno vsebnostjo lipidov), je lahko C_a dodatno izražen v $g \cdot kg^{-1}$ vsebnosti lipidov v organizmu, C_s pa je lahko izražen v $g \cdot kg^{-1}$ organskega ogljika (OC) v tleh,

— BAF (izražen v kg zemljine$\cdot kg^{-1}$ črvov), konstanta hitrosti absorpcije zemljine k_s (izražena v g zemljine kg^{-1} črvov dan^{-1}) in konstanta hitrosti izločanja k_e (izražena v dan^{-1}); v poročilu je lahko dodatno naveden BSAF (izražen v kg zemljine OC kg^{-1} vsebnosti lipidov v črvih),

▼M4

— če so bili izmerjeni: odstotni deleži matične kemikalije, metabolitov in vezanih ostankov (tj. odstotni delež preskusne kemikalije, ki ga ni mogoče ekstrahirati z običajnimi metodami ekstrakcije), zaznani v tleh in preskusnih živalih,

— metode, uporabljene za statistično analizo podatkov.

Vrednotenje rezultatov:

— skladnost rezultatov z merili veljavnosti, navedenimi v odstavku 17,

— nepričakovani ali nenavadni rezultati, npr. nepopolno izločanje preskusne kemikalije iz preskusnih živali.

VIRI:

(1) Amorim, M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688–00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676–04: str. 26.

(4) Beek, B., Boehling, S., Bruckmann, U., Franke, C., Joehncke, U., Studinger, G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (urednik), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (urednik zvezka: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

(5) Belfroid, A., Sikkenk, M., Seinen, W., Van Gestel, C., Hermens, J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

(6) Belfroid, A., Van Wezel, A., Sikkenk, M., Van Gestel, C., Seinen, W. & Hermens, J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

(7) Belfroid, A., Meiling, J., Drenth, H., Hermens, J., Seinen, W., Van Gestel, C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

(8) Bell, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

(9) Bligh, E. G., in Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

(10) Bouche, M. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, str. 671.

(11) Bruns, E., Egeler, Ph., Moser, T., Römbke, J., Scheffczyk, A., Spörlein, P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns, E., Egeler, Ph., Römbke, J. Scheffczyk, A., Spörlein, P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

(13) Conder, J. M., in Lanno, R. P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

(14) Connell, D. W., in Markwell, R. D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

(15) Didden, W. A. M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

(16) Didden, W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (ur.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, str. 555–576.

(17) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D., Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich, D. R., Schmid, P., Zweifel, U., Schlatter, C., Jenni-Eiermann, S., Bachmann, H., Bühler, U., Zbinden, N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

(19) Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH), o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije ter spremembi Direktive 1999/45/ES ter razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES (UL L 396, 30.12.2006, str. 1).

(20) Edwards, C. A., in Bohlen, P. J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, str. 426.

(21) OECD (2008), Bioakumulacija v bentoških maloščetincih, ki živijo v usedlinah, Smernica za preskušanje št. 315, Smernice za preskušanje kemikalij, OECD, Pariz.

(22) Egeler, Ph., Gilberg, D., Scheffczyk, A., Moser, Th., in Römbke, J. (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: str. 149. Na voljo za prenos na: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard, N., in Jagers op Akkerhuis, G. A. J. M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: str. 57.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

(26) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

(27) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

(28) Füll, C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, str. 156.

▼M4

(29) Füll, C., Schulte, C., Kula, C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

(30) Gabric, A. J., Connell, D. W., Bell, P. R. F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

(31) Gardner, W. S., Frez, W. A., Cichocki, E. A., Parrish, C. C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

(32) Hawker, D. W., in Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

(33) Hund-Rinke, K., in Wiechering, H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

(34) Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F., Achazi, R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (ur.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

(35) ISO 11268-2 (1998). Kakovost tal – Vpliv onesnaževal na deževnike (*Eisenia fetida*). Del 2: Določanje vplivov na razmnoževanje.

(36) Jaenike, J. (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

(37) Jager, T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

(38) Jager, T., Sanchez, P. A., Muijs, B., van der Welde, E., Posthuma, L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

(39) Jager, T., Baerselman, R., Dijkman, E., De Groot, A. C., Hogendoorn, E. A., DeJong, A., Kruitbosch, J. A. W., Peijnenburg, W. J. G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

(40) Jager, T., Fleuren, R. L. J., Hoogendoorn, E., de Korte, G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

(41) Janssen, M. P. M., Bruins, A., De Vries, T. H., Van Straalen, N. M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

(42) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

(43) Khalil, A. M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, str. 137.

(44) Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

(45) Marinussen, M. P. J. C., Van der Zee, S. E. A. T. M., De Haan, F. A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

(46) Mount, D. R., Dawson, T. D., Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼M4

(47) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Poglavje C.8 te priloge, Strupenost za deževnike.

(49) Poglavje C.13 te priloge, Biokoncentracija: pretočni preskus na ribah.

(50) Poglavje C.21 te priloge, Talni mikroorganizmi: preskus transformacije dušika.

(51) OECD (2004a), Preskus razmnoževanja enhitrejev, Smernica za preskušanje št. 220, Smernice za preskušanje kemikalij, OECD, Pariz.

(52) OECD (2004b), Preskus razmnoževanja deževnikov (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Smernica za preskušanje št. 222, Smernice za preskušanje kemikalij, OECD, Pariz.

(53) OECD (2008), Bioakumulacija v bentoških maloščetincih, ki živijo v usedlinah, Smernica za preskušanje št. 315, Smernice za preskušanje kemikalij, OECD, Pariz.

(54) Petersen, H., in Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

(55) Phillips, D. J. H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ur.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

(56) Pflugmacher, J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

(57) Posthuma, L., Weltje, L., Anton-Sanchez, F. A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall, R. C., Lee, II. H., Ozretich, R. J., Lake, J. L., Pruell, R. J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

(59) Römbke, J., Egele, P., Füll, C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke, J. in Moser, Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: str. 373.

(61) Römbke, J., Riepert, F., Achazi, R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (ur.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

(62) Romijn, C. A. F. M., Luttik, R., Van De Meent, D., Slooff, W., Canton, J. H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

(63) Sample, B. E., Suter, D. W., Beauchamp, J. J., Efroymson, R. A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

(64) Schlosser, H.-J., in Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

(65) Schmelz, R., in Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims, R. W., in Gerard, B. M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa, J. P., Loureiro, S., Pieper, S., Frost, M., Kratz, W., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie, A. in Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

(69) Stephenson, G. L., Kaushik, A., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., Steele, T., Scroggins, R. P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (ur.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

(70) Sterenborg, I., Vork, N. A., Verkade, S. K., Van Gestel, C. A. M., Van Straalen, N. M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

(73) Van Brummelen, T. C. in Van Straalen, N. M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

(74) Van Gestel, C. A. M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ur. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel, C. A., in Ma, W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

(76) Van Straalen, N. M., Donker, M. H., Vijver, M. G., van Gestel, C. A. M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

(77) Venter, J. M. in Reinecke, A. J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

(78) Vijver, M. G., Vink, J. P. M., Jager, T., Wolterbeek, H. T., van Straalen, N. M., van Gestel, C. A. M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

(79) Widianarko, B., in Van Straalen, N. M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Bioakumulacija je povečanje koncentracije preskusne kemikalije v organizmu ali na njem, glede na koncentracijo preskusne kemikalije v okoliškem mediju. Izhaja iz procesov biokoncentracije in biomagnifikacije (glej spodaj);

biokoncentracija je povečanje koncentracije preskusne kemikalije v organizmu ali na njem zaradi absorpcije kemikalije izključno iz okoliškega medija (tj. prek telesne površine in z zaužitjem), ki je odvisna od koncentracije preskusne kemikalije v okoliškem mediju;

biomagnifikacija je povečanje koncentracije preskusne kemikalije v organizmu ali na njem predvsem zaradi absorpcije iz kontaminirane hrane ali plena, ki je odvisna od koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali plenu. Biomagnifikacija lahko vodi do prenosa ali kopičenja preskusne snovi v prehranjevalnem spletu;

izločanje preskusne kemikalije je odstranitev te kemikalije iz tkiva preskusnega organizma z aktivnimi ali pasivnimi procesi, ki se pojavijo neodvisno od prisotnosti ali odsotnosti preskusne snovi v okoliškem mediju;

bioakumulacijski faktor (BAF) ob katerem koli času v fazi absorpcije tega preskusa bioakumulacije je koncentracija preskusne kemikalije v/na preskusnem organizmu (C_a v $g \cdot kg^{-1}$ suhe teže črva), deljena s koncentracijo kemikalije v okoliškem mediju (C_s v $g \cdot kg^{-1}$ suhe teže zemljine); BAF se izrazi v enotah kg zemljine$\cdot kg^{-1}$ črvov;

bioakumulacijski faktor stabilnega stanja (BAF_{ss}) je BAF v stabilnem stanju in se ne spreminja znatno v daljšem časovnem obdobju, saj je koncentracija preskusne kemikalije v okoliškem mediju (C_s v $g \cdot kg^{-1}$ suhe teže zemljine) v tem obdobju konstantna;

bioakumulacijski faktorji, izračunani neposredno iz razmerja med konstanto hitrosti absorpcije tal in konstanto hitrosti izločanja (k_s in k_e, glej spodaj), se imenujejo kinetični bioakumulacijski faktor (BAF_K);

faktor akumulacije v organizmih glede na tla (BSAF) je na lipide normalizirana koncentracija preskusne kemikalije v/na preskusnem organizmu, deljena s koncentracijo preskusne kemikalije v tleh v stabilnem stanju, normalizirano na organski ogljik. C_a se tako izrazi kot $g \cdot kg^{-1}$ vsebnosti lipidov v organizmu, C_s pa kot $g \cdot kg^{-1}$ vsebnosti organskega ogljika v tleh; BSAF se izrazi v enotah kg OC$\cdot kg^{-1}$ lipidov;

konstantna raven ali **stabilno stanje** je opredeljeno kot ravnotežje med procesoma absorpcije in izločanja, ki potekata hkrati v fazi izpostavljenosti. Stabilno stanje je v grafičnem prikazu BAF v odvisnosti od časa doseženo, ko krivulja postane vzporedna s časovno osjo in se tri zaporedne analize BAF na vzorcih, vzetih v razmiku najmanj dveh dni, druga od druge ne razlikuje za več kot 20 % ter ni statistično značilnih razlik med tremi obdobji vzorčenja. Za preskusne kemikalije, ki se počasi absorbirajo, so primernejši sedemdnevni razmiki (49);

koeficient porazdelitve organski ogljik/voda (K_{oc}) je razmerje med koncentracijo kemikalije v/na delu tal z organskim ogljikom in koncentracijo kemikalije v vodi v ravnotežju;

koeficient porazdelitve oktanol/voda (K_{ow}) je uravnoteženo razmerje topnosti kemikalije v n-oktanolu in vodi, včasih izraženo tudi kot P_{ow}. Logaritem K_{ow} (log K_{ow}) se uporablja kot kazalnik potenciala kemikalije za kopičenje v vodnih organizmih;

▼M4

faza absorpcije ali izpostavitve je čas, v katerem so preskusni organizmi izpostavljeni preskusni kemikaliji;

konstanta hitrosti absorpcije tal (k_s) je numerična vrednost, ki opredeljuje stopnjo povišanja koncentracije preskusne snovi v/na preskusnem organizmu zaradi absorpcije iz talne faze. Konstanta k_s se izrazi v g zemljine kg^{-1} črvov d^{-1};

faza izločanja je čas po prenosu preskusnih organizmov iz kontaminiranega medija v medij brez preskusne snovi, v katerem se preučuje izločanje (ali neto izguba) kemikalije iz preskusnih organizmov;

konstanta hitrosti izločanja (k_e) je numerična vrednost, ki opredeljuje stopnjo znižanja koncentracije preskusne snovi v/na preskusnih organizmih po prenosu preskusnih organizmov iz medija s preskusno snovjo v medij brez kemikalije; k_e se izrazi v d^{-1};

preskusna kemikalija: snov ali zmes, preskušana z uporabo te preskusne metode.

▼M4

Dodatek 2

Izračun parametrov absorpcije in izločanja

Glavni cilj preskusa bioakumulacije je določitev bioakumulacijskega faktorja BAF. Izmerjeni BAF je mogoče izračunati z deljenjem koncentracije v preskusnem organizmu C_a s koncentracijo v tleh C_s v stabilnem stanju. Če v fazi absorpcije stabilno stanje ni doseženo, se BAF_K izračuna iz konstant hitrosti namesto iz BAFss. Vendar je treba navesti, ali BAF temelji na koncentracijah v stabilnem stanju ali ne.

Kinetični bioakumulacijski faktor (BAF_K), konstanta hitrosti absorpcije tal (k_s) in konstanta hitrosti izločanja (k_e) se običajno dobijo z računalniškimi metodami za ocenjevanje nelinearnih parametrov, npr. na podlagi modelov, opisanih v (68). Na podlagi skupine podatkov o zaporednih koncentracijah v odvisnosti od časa in modelnih enačb:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[enačba 1]}$$

ali

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[enačba 2]}$$

pri čemer je:

C_a = koncentracija kemikalije v črvih [g·kg-1 mokre ali suhe teže],

k_s = konstanta hitrosti absorpcije v tkivu [g zemljine kg-1 črvov d-1],

C_s = koncentracija kemikalije v tleh [g·kg-1 mokre ali suhe teže],

k_e = konstanta hitrosti izločanja [d-1],

t_c = čas na koncu faze absorpcije,

ti računalniški programi izračunajo vrednosti BAF_K, k_s in k_e.

Kadar se koncentracija ozadja pri neizpostavljenih črvih, npr. na dan 0, znatno razlikuje od nič (tako je lahko na primer pri kovinah), mora biti ta koncentracija ozadja ($C_{a,0}$) vključena v te enačbe, tako da se glasijo:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[enačba 3]}$$

in

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[enačba 4]}$$

Kadar se v fazi absorpcije ugotovi znatno zmanjšanje koncentracije preskusne kemikalije v tleh v odvisnosti od časa, je mogoče uporabiti naslednje modele, npr. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[enačba 5]}$$

▼M4

pri čemer je:

C_s = koncentracija kemikalije v tleh [g·kg-1 mokre ali suhe teže],

k_0 = konstanta hitrosti razgradnje v tleh [d-1],

C_0 = začetna koncentracija kemikalije v tleh [g·kg-1 mokre ali suhe teže].

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[enačba 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[enačba 7]}$$

pri čemer je:

C_a = koncentracija kemikalije v črvih [g·kg-1 mokre ali suhe teže],

k_s = konstanta hitrosti absorpcije v tkivu [g zemljine kg-1 črvov d-1],

k_0 = konstanta hitrosti razgradnje v tleh [d-1],

k_e = konstanta hitrosti izločanja [d-1],

t_c = čas na koncu faze absorpcije.

Kadar je v fazi absorpcije doseženo stabilno stanje (tj. $t = \infty$), je mogoče enačbo 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[enačba 1]}$$

skrajšati na:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ali

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[enačba 8]}$$

Nato je k_s/k_e x C_s pristop za ugotavljanje koncentracije preskusne snovi v črvjem tkivu v stabilnem stanju ($C_{a,ss}$).

Faktor akumulacije v organizmih glede na tla (BSAF) je mogoče izračunati na naslednji način:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[enačba 9]}$$

pri čemer je f_{oc} del organskega ogljika v tleh, f_{lip} pa del lipidov v črvih, pri čemer sta oba po možnosti določena na vzorcih, vzetih v preskusu, ter temeljita na suhi teži oziroma mokri teži.

Model kinetike izločanja je mogoče oblikovati na podlagi podatkov iz faze izločanja ter z uporabo spodnje modelne enačbe in računalniške metode za ocenjevanje nelinearnih parametrov. Če podatkovne točke, grafično prikazane v odvisnosti od časa, nakazujejo konstantno eksponentno padanje koncentracije preskusne snovi v živalih, je mogoče za opis časovnega poteka izločanja uporabiti enodelni model (enačba 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[enačba 10]}$$

▼M4

Procesi izločanja so včasih videti dvofazni, pri čemer v zgodnjih fazah C_a hitro upada, kar se v poznejših fazah izločanja spremeni v počasnejšo izgubo preskusnih snovi, npr. (27) (68). Dve fazi je mogoče razložiti s predpostavko, da sta v organizmu dva različna dela, iz katerih se preskusna snov izloča z različno hitrostjo. V takih primerih je treba preučiti posebne vire, npr. (38) (39) (40) (78).

Z zgornjimi modelnimi enačbami je mogoče kinetična parametra (k_s in k_e) izračunati tudi naenkrat z modelom kinetike prvega reda za vse podatke iz faz absorpcije in izločanja hkrati. Opis metode, ki lahko omogoča tak združeni izračun konstant hitrosti absorpcije in izločanja, je na voljo v virih (191), (223) in (220).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[enačba 11]}$$

Opomba: kadar se parametra absorpcije in izločanja ocenjujeta hkrati iz združenih podatkov o absorpciji in izločanju, je „m“, kot je prikazan v enačbi 11, deskriptor, ki računalniškemu programu omogoča, da podizraze v enačbi pripiše skupinam podatkov iz zadevne faze in da pravilno izvede ocenjevanje (m = 1 za fazo absorpcije; m = 2 za fazo izločanja).

Vseeno je treba te modelne enačbe uporabljati previdno, zlasti kadar se med preskusom pojavijo spremembe v biološki razpoložljivosti preskusne kemikalije ali (biološki) razgradnji (glej npr. (79)).

▼M4

Dodatek 3

PRIMERI ČASOVNIH RAZPOREDOV ZA PRESKUSE BIOAKUMULACIJE V TLEH

Preskus z deževniki

(a) Faza absorpcije z 8 datumi vzorčenja za izračun kinetike

Dan	Dejavnost
– 6	48-urno kondicioniranje pripravljene zemljine;
– 4	dodajanje raztopine preskusne kemikalije v del zemljine; izparevanje morebitnega topila; mešanje sestavin zemljine; razporejanje zemljine v preskusne posode; 4-dnevno vzpostavljanje ravnotežja v preskusnih pogojih (3 tedne za zemljine s primešano kovino);
– 3 do – 1	izločevanje preskusnih organizmov iz gojišča za aklimatizacijo; priprava in vlaženje sestavin zemljine;
0	merjenje temperature in vrednosti pH tal; odstranjevanje vzorcev tal iz tretiranih posod in kontrolnih vzorcev s topilom za določitev koncentracije preskusne kemikalije; dodajanje obroka hrane; tehtanje in naključna razporeditev črvov v preskusne posode; zadržanje zadostnih podvzorcev črvov za določanje analitskih vrednosti ozadja, mokre in suhe teže ter vsebnosti lipidov; tehtanje vseh preskusnih posod za kontrolo vlage v tleh; kontrola dotoka zraka, če se uporabi zaprt preskusni sistem;
1	kontrola dotoka zraka, zapisovanje obnašanja črvov in temperature; jemanje vzorcev tal in črvov za določitev koncentracije preskusne snovi;
2	enako kot 1. dan;
3	kontrola dotoka zraka, obnašanja črvov in temperature;
4	enako kot 1. dan;
5–6	enako kot 3. dan;
7	enako kot 1. dan; dodajanje obroka hrane; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod in nadomeščanje izhlapele vode;
8–9	enako kot 3. dan;
10	enako kot 1. dan;
11–13	enako kot 3. dan;
14	enako kot 1. dan; dodajanje obroka hrane; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod in nadomeščanje izhlapele vode;
15–16	enako kot 3. dan;
17	enako kot 1. dan;
18–20	enako kot 3. dan;

▼**M4**

Dan	Dejavnost
21	enako kot 1. dan; merjenje temperature in vrednosti pH tal; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod; konec faze absorpcije; premestitev črvov iz preostalih izpostavljenih ponovitev v posode s čisto zemljino za fazo izločanja (brez praznjenja prebavil); vzorčenje tal in črvov iz kontrolnih vzorcev s topilom.
	Dejavnosti pred izpostavljenostjo (faza uravnoteženja) je treba časovno načrtovati ob upoštevanju lastnosti preskusne kemikalije.
	Dejavnosti, opisane za 3. dan, je treba izvajati dnevno (vsaj ob delovnikih).

(b) Faza izločanja

Dan	Dejavnost
– 6	Priprava in vlaženje sestavin zemljine; 48-urno kondicioniranje pripravljene zemljine;
– 4	mešanje sestavin zemljine; razporejanje zemljine v preskusne posode; 4-dnevna inkubacija v preskusnih pogojih;
0 (konec faze absorpcije)	merjenje temperature in vrednosti pH tal; tehtanje in naključna razporeditev črvov v preskusne posode; dodajanje obroka hrane; premestitev črvov iz preostalih izpostavljenih ponovitev v posode s čisto zemljino; jemanje vzorcev tal in črvov po 4–6 urah za določitev koncentracije preskusne kemikalije;
1	kontrola dotoka zraka, zapisovanje obnašanja črvov in temperature; jemanje vzorcev tal in črvov za določitev koncentracije preskusne kemikalije;
2	enako kot 1. dan;
3	kontrola dotoka zraka, obnašanja črvov in temperature;
4	enako kot 1. dan;
5–6	enako kot 3. dan;
7	enako kot 1. dan; dodajanje obroka hrane; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod in nadomeščanje izhlapele vode;
8–9	enako kot 3. dan;
10	enako kot 1. dan;
11–13	enako kot 3. dan;
14	enako kot 1. dan; dodajanje obroka hrane; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod in nadomeščanje izhlapele vode;
15–16	enako kot 3. dan;
17	enako kot 1. dan;

▼**M4**

Dan	Dejavnost
18–20	enako kot 3. dan;
21	enako kot 1. dan; merjenje temperature in vrednosti pH tal; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod; vzorčenje tal in črvov iz kontrolnih vzorcev s topilom.
	Tla pred začetkom faze izločanja je treba pripraviti enako kot pred fazo absorpcije.
	Dejavnosti, opisane za 3. dan, je treba izvajati dnevno (vsaj ob delovnikih).

Preskus z enhitreji

(a) Faza absorpcije z 8 datumi vzorčenja za izračun kinetike

Dan	Dejavnost
– 6	48-urno kondicioniranje pripravljene zemljine;
– 4	dodajanje raztopine preskusne kemikalije v del zemljine; izparevanje morebitnega topila; mešanje sestavin zemljine; razporejanje zemljine v preskusne posode; 4-dnevno vzpostavljanje ravnotežja v preskusnih pogojih (3 tedne za zemljinela s primešano kovino);
–3 do –1	izločevanje preskusnih organizmov iz gojišča za aklimatizacijo; priprava in vlaženje sestavin zemljine;
0	merjenje temperature in vrednosti pH tal; odstranjevanje vzorcev tal iz tretiranih posod in kontrolnih vzorcev s topilom za določitev koncentracije preskusne kemikalije; dodajanje obroka hrane v tla; tehtanje in naključna razporeditev črvov v preskusne posode; zadržanje zadostnih podvzorcev črvov za določanje analitskih vrednosti ozadja, mokre in suhe teže ter vsebnosti lipidov; tehtanje vseh preskusnih posod za kontrolo vlage v tleh; kontrola dotoka zraka, če se uporabi zaprt preskusni sistem;
1	kontrola dotoka zraka, zapisovanje obnašanja črvov in temperature; jemanje vzorcev tal in črvov za določitev koncentracije preskusne snovi;
2	enako kot 1. dan;
3	kontrola dotoka zraka, obnašanja črvov in temperature;
4	enako kot 1. dan;
5–6	enako kot 3. dan;
7	enako kot 1. dan; dodajanje obroka hrane v tla; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod in nadomeščanje izhlapele vode;
9	enako kot 1. dan;
10	enako kot 3. dan;

▼**M4**

Dan	Dejavnost
11	enako kot 1. dan;
12–13	enako kot 3. dan;
14	enako kot 1. dan; dodajanje obroka hrane v tla; merjenje temperature in vrednosti pH tal; kontrola vlage v tleh s ponovnim tehtanjem preskusnih posod; konec faze absorpcije; premestitev črvov iz preostalih izpostavljenih ponovitev v posode s čisto zemljino za fazo izločanja (brez praznjenja prebavil); vzorčenje tal in črvov iz kontrolnih vzorcev s topilom.
	Dejavnosti pred izpostavljenostjo (faza uravnoteženja) je treba časovno načrtovati ob upoštevanju lastnosti preskusne kemikalije.
	Dejavnosti, opisane za 3. dan, je treba izvajati dnevno (vsaj ob delovnikih).

▼M4

Dodatek 4

Umetna zemljina – priporočila glede priprave in shranjevanja

Ker naravna zemljina iz določenega vira ni nujno na voljo vse leto in ker lahko domorodni organizmi in prisotna mikroonesnaževala vplivajo na preskus, se za ta preskus priporoča umetni substrat – umetna zemljina v skladu s poglavjem C.8 te priloge, Strupenost za deževnike (48). V takih tleh lahko preživi, raste in se razmnožuje več preskusnih vrst, zagotovljeni pa so tudi največja mogoča standardizacija ter primerljivost preskusnih pogojev in pogojev gojenja znotraj laboratorija in med laboratoriji.

Sestavine zemljine

Šota:	10 %	Šotni mah, v skladu s smernico OECD 207 (48).
Kremenov pesek:	70 %	Industrijski kremenov pesek (sušen na zraku); velikost zrnc: več kot 50 % delcev mora biti velikih 50 do 200 μm, vsi delci pa morajo biti ≤ 2 mm.
Kaolinska glina:	20 %	Vsebnost kaolinita ≥ 30-odstotna.
Kalcijev karbonat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, zdrobljen v prah, kemijsko čist.

Lahko se tudi zmanjša vsebnost organskega ogljika v umetni zemljini, npr. z zmanjšanjem vsebnosti šote na 4–5 % suhe zemljine in ustreznim povečanjem vsebnosti peska. S takim zmanjšanjem vsebnosti organskega ogljika se lahko zmanjšajo možnosti adsorpcije preskusne kemikalije na zemljino (organski ogljik), razpoložljivost preskusne kemikalije za črve pa se lahko poveča (74). Dokazano je, da lahko *Enchytraeus albidus* in *Eisenia fetida* izpolnjujeta merila veljavnosti v zvezi z razmnoževanjem, če se preskus izvaja z naravno zemljino z manjšo vsebnostjo organskega ogljika, npr. 2,7 % (33), (211), izkušnje pa kažejo, da je to mogoče doseči tudi pri umetni zemljini s 5 % šote.

Priprava

Suhe sestavine zemljine se temeljito premešajo (npr. v velikem laboratorijskem mešalniku). To je treba storiti približno en teden pred začetkom preskusa. Zmešane suhe sestavine zemljine je treba navlažiti z deionizirano vodo vsaj 48 h pred primešanjem preskusne snovi, da se kislost uravnoteži/stabilizira. Za določitev pH se uporabi mešanica zemljine in 1 M raztopine KCl v razmerju 1 : 5. Če vrednost pH ni znotraj zahtevanega obsega (6,0 ± 0,5), se zemljini doda zadostna količina $CaCO_3$ ali pripravi nova šarža zemljine.

Največja zmogljivost zadrževanja vode (WHC) v umetni zemljini se določi v skladu z ISO 11268-2 (35). Vsaj dva dneva pred začetkom preskusa se suha umetna zemljina navlaži z dovolj deionizirane ali rekonstituirane vode, da nastane približno polovica končne vsebnosti vode. Končna vsebnost vode mora biti med 40 in 60 % največje WHC. Na začetku preskusa se predhodno navlažena zemljina razdeli na toliko šarž, kot je preskusnih koncentracij in kontrolnih vzorcev, uporabljenih v preskusu, vsebnost vlage pa se prilagodi na 40–60 % WHC_{max} z raztopino preskusne snovi in/ali dodajanjem deionizirane ali rekonstituirane vode. Vsebnost vlage se določi na začetku in koncu preskusa (pri 105 °C). Biti mora optimalna za potrebe uporabljenih vrst živali (vsebnost vlage je mogoče preveriti tudi na naslednji način: če se zemljina nežno stisne v roki, se morajo med prsti pojaviti majhne kapljice vode).

▼M4

Shranjevanje

Suhe sestavine umetne zemljine se lahko do uporabe hranijo pri sobni temperaturi. Pripravljena predhodno navlažena zemljina se lahko hrani na hladnem do tri dni pred primešanjem preskusne kemikalije; paziti je treba, da je izhlapevanje vode čim manjše. Zemljino s primešano preskusno snovjo je treba uporabiti takoj, razen če obstajajo podatki o tem, da je mogoče določeno zemljino shranjevati, ne da bi to vplivalo na strupenost in biološko razpoložljivost preskusne snovi. Vzorci zemljine s primešano preskusno snovjo se lahko nato do analize hranijo v pogojih, priporočenih za zadevno preskusno snov.

▼M4

Dodatek 5

Vrste kopenskih maloščetincev, priporočene za preskušanje bioakumulacije iz tal

Deževniki

Priporočena preskusna vrsta je *Eisenia fetida* (Savigny 1826), ki spada v družino *Lumbricidae*. Od leta 1972 se deli na dve podvrsti (*Eisenia fetida* in *Eisenia andrei* (10)). Jaenike trdi (36), da sta to pravi ločeni vrsti. Vrsto *Eisenia fetida* je mogoče brez težav prepoznati po svetlih rumenih črtah med kolobarji, *Eisenia andrei* pa je enotne temno rdeče barve. Izvirajo verjetno iz črnomorske regije, danes pa so razširjeni po vsem svetu, zlasti v antropogeno prilagojenih habitatih, kot so kompostni kupi. Obe podvrsti je mogoče uporabljati za ekotoksikološke in bioakumulacijske preskuse.

Eisenia fetida in *Eisenia andrei* sta komercialno dostopni vrsti, npr. kot vaba za ribe. V primerjavi z drugimi deževniki iz družine *Lumbricidae* imajo kratek življenjski ciklus in dosežejo zrelost pri približno 2–3 mesecih (pri sobni temperaturi). Njihova optimalna temperatura je približno 20–24 °C. Najraje imajo razmeroma vlažne substrate s skoraj nevtralno vrednostjo pH in visoko vsebnostjo organske snovi. Ker se ti vrsti zelo pogosto uporabljata v standardiziranih ekotoksikoloških preskusih že približno 25 let, je njuno gojenje dobro uveljavljeno (48) (77).

Obe vrsti je mogoče gojiti v zelo različnih živalskih odpadkih. Medij za gojenje, priporočen v ISO (35), je mešanica konjskega ali govejega gnoja in šote v razmerju 50: 50. Medij mora imeti vrednost pH približno 6–7 (uravnavano s kalcijevim karbonatom), majhno ionsko prevodnost (manj kot 6 mS/cm ali manj kot 0,5-odstotna koncentracija soli) in ne sme biti pretirano kontaminiran z amonijem ali živalskim urinom. Uporabiti je mogoče tudi komercialno vrtno prst brez aditivov ali umetno zemljino v skladu z OECD (48) ali mešanico obeh v razmerju 50: 50. Substrat mora biti vlažen, vendar ne preveč moker. Primerne so škatle za gojenje s prostornino 10 do 50 litrov.

Za črve standardne starosti in teže je gojenje najbolje začeti s kokoni. Zato se v škatle za gojenje s svežim substratom dajo odrasli črvi, da naredijo kokone. Praktične izkušnje so pokazale, da so pri gostoti populacije približno 100 odraslih črvov na kg substrata (mokra teža) dobre stopnje razmnoževanja. Po 28 dneh se odrasli črvi odstranijo. Deževniki, ki se izležejo iz kokonov, se uporabijo za preskušanje, ko so zreli, po vsaj 2 mesecih, vendar prej kot v 12 mesecih.

Črve zgoraj opisanih vrst je mogoče šteti za zdrave, če se premikajo skozi substrat, ga ne poskušajo zapustiti in se stalno razmnožujejo. Zelo počasno premikanje ali rumen zadnji del (pri vrsti *Eisenia fetida*) kaže na izčrpanje substrata. V tem primeru se priporoča svež substrat in/ali manjše število živali na škatlo.

Dodatni izbrani viri

Gerard, B. M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff, O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke, J., Egeler, P., Füll, C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren, S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell, J. E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼M4

Sims, R. W., in Gerard, B. M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin, A. D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ur.), Chapman & Hall, London. str. 331–338.

Enhitreji

Priporočena preskusna vrsta je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (enhitrej). *Enchytraeus albidus* je ena od največjih (do 15 mm) vrst maloščetinarjev kolobarnikov iz družine *Enchytraeidae* in je razširjena po vsem svetu, npr. (8). Živi v morskih, sladkovodnih in kopenskih habitatih, večinoma v razpadajoči organski snovi (morske alge, kompost), redko pa na travnikih (42). Ta široka ekološka toleranca in nekatere morfološke variacije kažejo na to, da morda obstajajo različne podvrste te vrste.

Enchytraeus albidus je komercialno dostopna vrsta in se prodaja kot hrana za ribe. Treba je preveriti, ali je kultura kontaminirana z drugimi, običajno manjšimi vrstami (60). Ob kontaminaciji je treba vse črve oprati z vodo v petrijevki. Nato se (s stereomikroskopom) izberejo veliki odrasli osebki vrste *Enchytraeus albidus*, da se iz njih vzgoji nova kultura. Vsi drugi črvi se zavržejo. Življenjski ciklus enhitrejev je kratek, saj zrelost dosežejo v starosti med 33 dnevi (pri 18 °C) in 74 dnevi (pri 12 °C). Za preskus se uporabijo samo kulture, ki so bile v laboratoriju brez težav že vsaj 5 tednov (ena generacija).

Primerne so tudi druge vrste rodu *Enchytraeus*, zlasti *Enchytraeus luxuriosus*. Ta vrsta je pravi prebivalec tal, ki je bil na novo opisan v (65). Če se uporabijo druge vrste *Enchytraeus*, jih je treba jasno identificirati in poročati o razlogih za izbiro.

Enchytraeus crypticus (Westheide in Graefe 1992) je vrsta, ki spada v isto skupino kot *Enchytraeus luxuriosus*. Ni bilo nedvomno ugotovljeno, da obstaja v naravnem okolju, saj je bila opisana samo v kulturah deževnikov in kompostnih kupih (Römbke 2003). Njene izvirne ekološke potrebe zato niso znane. Toda nedavne laboratorijske raziskave z različnimi naravnimi zemljinami so potrdile, da ta vrsta dobro prenaša različne lastnosti tal, kot so pH in tekstura (Jänsch idr. 2005). V zadnjih letih se ta vrsta pogosto uporablja v ekotoksikoloških raziskavah, ker jo je preprosto gojiti in preskušati, npr. Kuperman idr. 2003. Vendar so te živali majhne (3–12 mm; povprečno 7 mm (Westheide in Müller 1996)), zato je z njimi težje ravnati kot z vrsto *Enchytraeus albidus*. Če se uporablja ta vrsta namesto vrste *Enchytraeus albidus*, je lahko preskusna posoda manjša, ni pa to nujno. Poleg tega je treba upoštevati, da se ta vrsta zelo hitro razmnožuje in da je obdobje ene generacije krajše od 20 dni pri 20 ± 2 °C (Achazi idr. 1999), pri višjih temperaturah pa še krajše.

Enchytraeidae vrste *Enchytraeus albidus* (in druge vrste roda *Enchytraeus*) je mogoče gojiti v velikih plastičnih škatlah (npr. 30 × 60 × 10 cm ali 20 × 12 × 8 cm, kar je primerno za kulturo majhnih črvov), napolnjenih z mešanico umetne zemljine in komercialne dostopne nekontaminirane vrtne prsti brez aditivov. Kompostnemu materialu se je treba izogibati, saj lahko vsebuje strupene kemikalije, kot so težke kovine. Živali je treba pred uporabo odstraniti iz zemljine za gojenje s trikratnim globokim zamrzovanjem. Uporabiti je mogoče tudi čisto umetno zemljino, vendar je lahko razmnoževanje počasnejše v primerjavi z mešanimi substrati. Substrat mora imeti pH 6,0 ± 0,5. Kultura se goji v inkubatorju pri temperaturi 15 ± 2 °C brez svetlobe. Vsekakor se je treba izogibati temperaturi, višji od 23 °C. Umetna/naravna zemljina mora biti vlažna, vendar ne mokra. Če se nežno stisne v roki, bi se morale pojaviti samo majhne kaplje vode. Vsekakor se je treba izogibati anoksičnim pogojem (npr. če se uporabi pokrov, mora število lukenj v pokrovu zadostovati za zadostno izmenjavo zraka). Tla za gojenje je treba enkrat tedensko prezračevati s pazljivim mešanjem.

▼M4

Črve je treba vsaj enkrat tedensko hraniti *ad libitum* z ovsenimi kosmiči, položenimi v luknjo na površini tal in pokritimi s prstjo. Če hrana, dodana na zadnji datum hranjenja, ostane v posodi, je treba količino hrane ustrezno prilagoditi. Če na preostali hrani zrasejo glive, jo je treba nadomestiti z novo količino ovsenih kosmičev. Za spodbujanje razmnoževanja se lahko ovsenim kosmičem vsaka dva tedna doda komercialno dostopen proteinski prah, obogaten z vitamini. Po treh mesecih se živali premestijo v sveže pripravljeno gojišče ali substrat za gojenje. Ovsene kosmiče, ki morajo biti shranjeni v zatesnjenih posodah, je treba pred uporabo avtoklavirati ali segreti, da se preprečijo okužbe s pršicami iz moke (npr. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) ali predatorskimi pršicami (npr. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Ko je hrana razkužena, jo je treba zmleti, da jo je mogoče z lahkoto potresti po površini tal. Vir hrane je lahko tudi pekovski kvas ali hrana za ribe TetraMin®.

Na splošno so pogoji gojenja zadovoljivi, če črvi ne poskušajo zapustiti substrata, se skozi tla hitro gibljejo, imajo bleščečo zunanjo površino brez delcev zemljine, ki bi se je držali, in so bolj ali manj belkaste barve ter če so vidni črvi različnih starosti. Dejansko je mogoče črve šteti za zdrave, če se stalno razmnožujejo.

Dodatni izbrani viri

Achazi, R. K., Fröhlich, E., Henneken, M., Pilz, C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch, S., Amorim, M. J. B., Römbke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman, R. G., Checkai, R. T., Simini, M., Phillips, C. T., Kolakowski, J. E., Kurnas, C. W., Sunahara, G. I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke, J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide, W., in Graefe, U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide, W., in Müller, M. C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼M6

C.31 PRESKUS KOPENSKIH RASTLIN: PRESKUS VZNIKA IN RASTI SEJANCEV:

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 208 (2006). Preskusne metode se ob upoštevanju znanstvenega napredka in uporabnosti za zakonodajno uporabo redno preverjajo. Ta posodobljena preskusna metoda je zasnovana za ocenjevanje potencialnih učinkov kemikalij na vznik in rast sejancev. Kot taka ne zajema kroničnih učinkov ali učinkov na razmnoževanje (npr. oploditev in razvoj semen, oblikovanje cvetov, zorenje plodov). Treba je upoštevati pogoje izpostavljenosti in lastnosti kemikalije, ki bo preskušena, s čimer se zagotovi uporaba ustreznih preskusnih metod (pri preskušanju kovin/kovinskih spojin je npr. treba upoštevati učinke vrednosti pH in povezanih protiionov) (1). Ta preskusna metoda ni namenjena rastlinam, ki so izpostavljene hlapom kemikalij. To preskusno metodo je mogoče uporabiti pri preskušanju splošnih kemikalij, biocidov in fitofarmacevtskih sredstev (ki so znani tudi kot izdelki za zaščito rastlin ali pesticidi). Razvita je bila na osnovi obstoječih metod (2)(3)(4)(5)(6)(7). Upoštevani so bili tudi drugi viri, ki se nanašajo na preskušanje rastlin (8)(9)(10). Uporabljene opredelitve so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

2. Preskus ocenjuje učinke na vznik sejancev in zgodnjo rast višjih rastlin po izpostavljenosti preskusni kemikaliji v tleh (ali drugem primernem matriksu tal). Semena se namestijo v stik s tlemi, tretiranimi s preskusno kemikalijo, po obdobju od 14 do 21 dni po 50-odstotnem vzniku sejancev v kontrolni skupini pa se ocenijo učinki nanje. Merjene končne točke so vizualna ocena vznika sejancev, suha teža poganjkov (alternativno sveža teža poganjkov) in v določenih primerih višina poganjkov ter ocena vidnih škodljivih učinkov na različne dele rastline. Meritve in opažanja se primerjajo s tistimi pri netretiranih kontrolnih rastlinah.

3. Odvisno od pričakovanega načina izpostavljenosti se preskusna kemikalija vnese v tla (ali v morebitni matriks umetnih tal) ali pa se nanese na površino tal; izbere se možnost, ki ustrezno predstavlja potencialni način izpostavljenosti kemikaliji. Vnos v tla se izvede s tretiranjem tal v razsutem stanju. Po nanosu se tla prenesejo v posode, nato pa se vanje posejejo semena dane rastlinske vrste. Nanosi na površino se izvedejo na tleh, prenesenih v posode, v katerih so že posejana semena. Preskusne enote (kontrole ter tretirana tla in semena) se nato namestijo v ustrezne pogoje, ki podpirajo kalitev/rast rastlin.

4. Lahko se izvede preskus za določanje krivulje odmerek-odziv ali pri eni sami koncentraciji/stopnji aplikacije kot mejni preskus v skladu s cilji študije. Če rezultati preskusa z eno samo koncentracijo/stopnjo aplikacije presegajo določeno raven strupenosti (npr. če so opaženi učinki večji od x %), se izvede preskus za določanje območja delovanja, s katerim se določijo zgornje in spodnje meje za strupenost, sledi pa mu preskus z več koncentracijami/stopnjami aplikacije za pridobitev krivulje odmerek-odziv. Uporabi se ustrezna statistična analiza za pridobitev učinkovite koncentracije EC_x ali učinkovite stopnje aplikacije ER_x (npr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) za najbolj občutljive zadevne parametre. V tem preskusu je mogoče izračunati tudi koncentracijo brez opaznega učinka (NOEC) in najnižjo koncentracijo z opaznim učinkom (LOEC).

PODATKI O PRESKUSNI KEMIKALIJI

5. Naslednji podatki so uporabni za ugotavljanje pričakovanega načina izpostavljenosti in pri načrtovanju preskusa: strukturna formula, čistost, topnost

▼M6

v vodi, obstojnost v organskih topilih, porazdelitveni koeficient 1-oktanol/voda, vedenje pri sorpciji v tleh, parni tlak, kemijska stabilnost v vodi in na svetlobi ter biorazgradljivost.

VELJAVNOST PRESKUSA

6. Da bi bil preskus veljaven, morajo kontrole izpolnjevati naslednja merila:

— vznik sejancev je vsaj 70-odstoten,

— sejanci ne kažejo vidnih fitotoksičnih učinkov (npr. kloroze, nekroze, venenja, deformacij listov in stebel), rastline pa izkazujejo le normalno variacijo rasti in morfologije za to določeno vrsto,

— srednja stopnja preživetja vzniknjenih kontrolnih sejancev v času trajanja študije je vsaj 90 %,

— okoljski pogoji za določeno vrsto so enaki in rastni substrati vsebujejo enako količino matriksa tal, podpornih substratov ali substrata iz istega vira.

REFERENČNA KEMIKALIJA

7. Referenčno kemikalijo je v rednih časovnih razmikih mogoče preskusiti, da se preveri, ali se izvedba preskusa ter odziv določenih preskusnih rastlin in preskusni pogoji skozi čas niso znatno spremenili. Namesto tega je mogoče za oceno učinkovitosti preskusnega sistema v določenih laboratorijih uporabiti pretekle meritve biomase ali rasti, kar lahko služi kot interni laboratorijski ukrep kontrole kakovosti.

OPIS METODE

Naravna tla – umetni substrat

8. Rastline je mogoče gojiti v posodah s peščeno ilovico, ilovnatim peskom ali peščeno glinasto ilovico, ki vsebuje do 1,5 odstotka organskega ogljika (pribl. 3 odstotke organske snovi). Uporabi se lahko tudi komercialna prst za sajenje lončnic ali sintetična mešanica tal, ki vsebuje do 1,5 odstotka organskega ogljika. Če je znano, da ima preskusna kemikalija visoko afiniteto za glino, se glinenih tal ne sme uporabljati. Naravna tla je treba presejati na 2-milimetrske delce, da se homogenizirajo in da se odstranijo grobi delci. Poročati je treba o vrsti in teksturi, odstotku organskega ogljika, vrednosti pH in vsebnosti soli, izmerjeni kot električna prevodnost končnih pripravljenih tal. Tla je treba razvrstiti v skladu s standardnim sistemom za razvrščanje (11). Tla se lahko pasterizirajo ali toplotno obdelajo, da se zmanjša učinek talnih patogenov.

9. Pri naravnih tleh je zaradi spreminjajočih se fizikalnih/kemijskih lastnosti in mikrobnih populacij razlaga rezultatov lahko bolj zapletena. Te spremenljivke spreminjajo sposobnost zadrževanja vlage, sposobnost vezave kemikalije, zračnost ter vsebino hranil in elementov v sledovih. Poleg variacij teh fizikalnih dejavnikov bo obstajala tudi variacija kemijskih lastnosti, kot sta vrednost pH in redoks potencial, ki lahko vpliva na biološko razpoložljivost preskusne kemikalije (12)(13)(14).

10. Umetni substrati se običajno ne uporabljajo za preskušanje fitofarmacevtskih sredstev, lahko pa so uporabni pri preskušanju splošnih kemikalij ali tam, kjer se želi kar najbolj zmanjšati variabilnost naravnih tal in povečati primerljivost rezultatov preskusa. Uporabljeni substrati morajo biti iz inertnih materialov, ki kar najbolj zmanjšajo interakcijo s preskusno kemikalijo ali

▼M6

topilom kot nosilcem ali pa z obema. Ugotovljeno je, da so s kislino opran kremenov pesek, mineralna volna in steklene kroglice (npr. s premerom od 0,35 do 0,85 mm) primerni inertni materiali, ki kar najmanj absorbirajo preskusno kemikalijo (15), kar omogoča, da je kemikalija z vsrkavanjem prek korenin v kar največji meri na voljo sejancu. Med neprimernimi substrati so vermikulit, perlit in drugi zelo absorptivni materiali. Zagotovljene morajo biti hranilne snovi za rast rastlin, ki poskrbijo, da rastline niso v stresu zaradi pomanjkanja hranilnih snovi, to pa je treba, kadar je le mogoče, oceniti s kemijsko analizo ali z vizualno oceno kontrolnih rastlin.

Merila za izbiro preskusnih vrst

11. Da izbrana vrsta razvije niz odzivov, mora biti razumno obsežna, npr. glede svoje taksonomske pestrosti v rastlinskem kraljestvu, svoje porazdelitve, pogostnosti, značilnosti življenjskega cikla posamezne vrste in območja pojavljanja v naravi (8)(10)(16)(17)(18)(19)(20). Pri izbiri je treba upoštevati naslednje značilnosti potencialnih preskusnih vrst:

— vrste imajo enotna semena, ki so lahko dostopna pri zanesljivih standardnih virih semen ter ki dosegajo skladno, zanesljivo in enakomerno kalivost ter enotno rast sejancev,

— rastlino je mogoče preskusiti v laboratoriju ter lahko daje zanesljive in ponovljive rezultate v okviru preskusnih infrastruktur in primerjalno med njimi,

— občutljivost preskušane vrste mora biti skladna z odzivi rastlin, odkritih v okolju, ki je izpostavljeno kemikaliji,

— vrste so bile do neke mere uporabljene v predhodnih preskusih strupenosti, njihova uporaba, npr. pri bioloških preskusih herbicidov, presejanju za težke kovine, obremenitvenih preskusih za slanost in minerale ali študijah alelopatije, pa kaže občutljivost na mnogo različnih obremenilnih dejavnikov,

— vrste so združljive z rastnimi pogoji preskusne metode,

— zadoščajo merilom za veljavnost preskusa.

Nekatere od preskusnih vrst, ki so bile v preteklosti najbolj uporabljane, so navedene v Dodatku 2, potencialne nekmetijske rastline pa v Dodatku 3.

12. Število vrst, ki bodo preskušene, je odvisno od ustreznih zakonskih zahtev, zato v tej preskusni metodi ni navedeno.

Uporaba preskusne kemikalije

13. Kemikalijo je treba nanesti v ustreznem nosilcu (npr. vodi, acetonu, etanolu, polietilen glikolu, gumi arabikumu, pesku). Mogoče je preskusiti tudi zmesi (formulirane produkte ali formulacije), ki vsebujejo aktivne snovi in različne adjuvanse.

Vnos v tla/umetni substrat

14. Kemikalije, ki so topne v vodi ali suspendirane v vodi, se lahko dodajo vodi, nato pa se raztopina z ustrezno napravo za mešanje zmeša s tlemi. Ta vrsta preskusa je lahko ustrezna, če izpostavljenost kemikaliji poteka prek tal ali porne vode v tleh in če obstajajo pomisleki glede vsrkavanja prek korenin. Zmogljivost tal za zadrževanje vode zaradi dodajanja preskusne kemikalije ne sme biti presežena. Količina dodane vode mora biti enaka za vsako preskusno koncentracijo, vendar mora biti omejena, da se prepreči zbiranje aglomeratov tal v skupkih.

▼M6

15. Kemikalije z nizko topnostjo v vodi je treba raztopiti v ustreznem hlapnem topilu (npr. acetonu, etanolu) in zmešati s peskom. Nato se med nenehnim mešanjem peska topilo lahko iz peska odstrani s tokom zraka. Tretirani pesek se zmeša z eksperimentalnimi tlemi. Vzpostavi se drug kontrolni vzorec, ki prejme le pesek in topilo. Vsem stopnjam tretiranja in drugi kontroli so dodane enake količine peska z zmešanim in odstranjenim topilom. Pri trdnih, netopnih preskusnih kemikalijah se suha tla in kemikalija zmešajo v ustrezni napravi za mešanje. Nato se tla dodajo v posode, v katere se takoj posejejo semena.

16. Če se namesto tal uporablja umetni substrat, je mogoče kemikalije, ki so topne v vodi, tik pred začetkom preskusa raztopiti v hranilni raztopini. Kemikalije, ki niso topne v vodi, a jih je mogoče v vodi suspendirati z nosilcem topila, je treba z nosilcem dodati hranilni raztopini. Kemikalije, ki niso topne v vodi in za katere ni na voljo nobenega nestrupenega nosilca, topnega v vodi, je treba raztopiti v ustreznem hlapnem topilu. Raztopina se zmeša s peskom ali steklenimi kroglicami in se namesti v rotavapor ter upari; na pesku oziroma kroglicah ostane enakomerna obloga kemikalije. Pred polnjenjem sadilne posode je treba tehtane deleže kroglic ekstrahirati z istim organskim topilom in preskušeno kemikalijo.

Nanos na površino

17. Za nanos preskusne kemikalije se pri fitofarmacevtskih sredstvih pogosto uporablja škropljenje površine tal s preskusno raztopino. Vsa oprema, uporabljena pri izvajanju preskusov, vključno z opremo za pripravo in dodajanje preskusne kemikalije, mora imeti takšni zasnovo in zmogljivost, da je mogoče preskuse, ki vključujejo to opremo, izvesti natančno, pokritost pa bo ponovljiva. Pokritost mora biti enotna prek celotne površine tal. Poskrbeti je treba, da ni možnosti adsorpcije kemikalije v opremo ali reagiranja kemikalije z opremo (npr. s plastičnimi cevmi in z lipofilnimi kemikalijami ali jeklenimi deli in elementi). Preskusna kemikalija se razprši na površino tal s posnemanjem značilnega nanašanja s škropilnico. V splošnem morajo biti količine razpršila v območju, ki se običajno uporablja v kmetijski praksi, o količinah (količini vode itd.) pa je treba poročati. Izbrati je treba tako vrsto šobe, ki bo omogočala enakomerno pokritost površine tal. Če se nanašajo topila in nosilci, je treba pripraviti drugo skupino kontrolnih rastlin, ki prejemajo le topilo/nosilec. To pri fitofarmacevtskih sredstvih, preskušanih v obliki formulacij, ni potrebno.

Preverjanje koncentracije/stopnje aplikacije preskusne kemikalije

18. Koncentracije/stopnje aplikacije je treba potrditi z ustreznim analitskim preverjanjem. Pri topnih kemikalijah je mogoče potrditi preverjanje koncentracij/stopenj aplikacije vseh preskusnih kemikalij z analizo preskusne raztopine z najvišjo koncentracijo, uporabljene pri preskusu, z dokumentacijo o naknadni razredčitvi in z uporabo umerjene opreme za nanos (npr. umerjenih steklenih posod za analizo, umerjene opreme za nanos s škropilnikom). Pri netopnih kemikalijah mora biti navedeno preverjanje spojin, poleg tega pa še mase preskusne kemikalije, dodane tlom. Če se zahteva dokazovanje homogenosti, bo morda potrebno analizirati tla.

POSTOPEK

Načrt preskusa

19. Semena istih vrst se posejejo v posode. Število semen, posejanih v posodo, je odvisno od vrste, velikosti posode in trajanja preskusa. Število rastlin na posodo mora biti takšno, da so v času trajanja preskusa omogočeni primerni rastni pogoji in da se prepreči nagnetenost. Največja gostota rastlin znaša

▼M6

približno 3–10 semen na 100 cm^2, odvisno od velikosti semen. Kot primer se za 15-centimetrsko posodo priporočajo od ena do dve sadiki koruze, soje, paradižnika, kumar ali sladkorne pese, tri sadike oljne ogrščice ali graha in od 5 do 10 sadik čebule, pšenice ali drugih sejancev z majhnimi semeni. Število semen in posod za ponovitve (ponovitev je opredeljena kot posoda, zato rastline v isti posodi ne predstavljajo ponovitve) mora biti zadostno za optimalno statistično analizo (21). Treba je opozoriti, da bo variabilnost večja za preskusne vrste, pri katerih je uporabljenih manj večjih semen na posodo (ponovitev), v primerjavi s preskusnimi vrstami, pri katerih je mogoče uporabljati večje število manjših semen na posodo. Ta variabilnost se lahko kar najbolj zmanjša s sejanjem enakega števila semen v vsako posodo.

20. Z uporabo kontrolnih skupin se zagotovi, da so opazni učinki povezani samo z izpostavljenostjo preskusni kemikaliji ali se jih lahko pripiše tej izpostavljenosti. Ustrezna kontrolna skupina mora biti v vseh vidikih identična preskusni skupini, razen glede izpostavljenosti preskusni kemikaliji. V okviru danega preskusa morajo biti vse preskusne rastline, vključno s kontrolnimi, iz istega vira. Za preprečevanje pristranskosti se zahteva naključno dodeljevanje preskusnih in kontrolnih posod.

21. Izogibati se je treba semenom, prevlečenim z insekticidom ali fungicidom (tj. „obloženim“ semenom). Vendar nekateri regulativni organi dovoljujejo uporabo določenih nesistemskih kontaktnih fungicidov (npr. kaptana, tirama) (22). Če obstaja skrb glede patogenov, ki se prenašajo s semeni, se semena lahko za kratek čas namočijo v razredčeno 5-odstotno raztopino hipoklorita, nato pa se dobro sperejo pod tekočo vodo in posušijo. Sanacija z drugimi fitofarmacevtskimi sredstvi ni dovoljena.

Preskusni pogoji

22. Preskusni pogoji se morajo približati pogojem, potrebnim za normalno rast preskušenih vrst in sort (v Dodatku 4 so navedeni primeri preskusnih pogojev). Rastline, ki vznikajo, se morajo vzdrževati glede na dobro vrtnarsko prakso v komorah, fitotronih ali rastlinjakih s kontroliranim okoljem. Pri uporabi prostorov, namenjenih za rast, te prakse običajno vključujejo nadzor in ustrezno pogosto (npr. dnevno) beleženje temperature, vlažnosti, koncentracije ogljikovega dioksida, svetlobe (obsevanosti, valovne dolžine, fotosintetsko aktivnega sevanja) in obdobja osvetljenosti, sredstev za zalivanje itd., s čimer se zagotovi zdrava rast, ki se presoja s kontrolnimi rastlinami izbranih vrst. Temperaturo v rastlinjakih je treba nadzirati z zračenjem, ogrevanjem in/ali hladilnimi sistemi. Za preskušanje v rastlinjakih se v splošnem priporočajo naslednji pogoji:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C,

— vlažnost; 70 % ± 25 %,

— obdobje osvetljenosti: najmanj 16 ur svetlobe,

— obsevanost: 350 ± 50 µE/m^2/s. Če obsevanost pade pod 200 µE/m^2/s, valovna dolžina pa je 400–700 nm, je potrebna dodatna osvetlitev, razen pri določenih vrstah, ki ne potrebujejo toliko svetlobe.

Med trajanjem študije je treba spremljati okoljske pogoje in poročati o njih. Rastline je treba gojiti v neporoznih plastičnih ali glaziranih posodah, pod katere so podstavljeni pladnji ali krožnički. Posode se lahko redno premešča,

▼M6

da je variabilnost pri rasti rastlin (zaradi razlik v preskusnih pogojih v prostorih, namenjenih za rast) čim manjša. Posode morajo biti dovolj velike, da se omogoči normalna rast.

23. Za ohranjanje vitalnosti rastlin se lahko hranilnim snovem v tleh dodajajo dodatki. O potrebah po dodatnih hranilnih snoveh in času njihovega dodajanja je mogoče presoditi z opazovanjem kontrolnih rastlin. Priporočeno je zalivanje preskusnih posod od spodaj (npr. s stenjem iz steklenih vlaken). Vendar je mogoče z začetnim zalivanjem od zgoraj spodbuditi kalivost semen, pri nanosu na površino tal pa takšno zalivanje olajša prehod kemikalije v tla.

24. Specifični rastni pogoji morajo biti ustrezni za preskušane vrste in preiskovano preskusno kemikalijo. Kontrolne in tretirane rastline je treba gojiti v enakih okoljskih pogojih, vendar je treba izvesti ustrezne ukrepe za preprečevanje navzkrižne izpostavljenosti (npr. hlapnim kemikalijam) med različnimi tretiranji in izpostavljenosti kontrolnih rastlin preskusnim kemikalijam.

Preskušanje pri eni sami koncentraciji/stopnji aplikacije

25. Za določanje ustrezne koncentracije/stopnje aplikacije kemikalije za izvedbo preskusa z eno samo koncentracijo ali stopnjo (provokacijskega/mejnega preskusa) je treba upoštevati več dejavnikov. Pri splošnih kemikalijah ti dejavniki vključujejo fizikalne/kemijske lastnosti kemikalije. Za fitofarmacevtska sredstva je treba upoštevati fizikalne/kemijske lastnosti in vzorec uporabe preskusne kemikalije, njeno največjo koncentracijo ali stopnjo aplikacije, število aplikacij na sezono in/ali obstojnost preskusne kemikalije. Za ugotavljanje, ali ima splošna kemikalija fitotoksične lastnosti, je lahko primerno preskušanje pri najvišji ravni 1 000 mg/kg suhih tal.

Preskus za določanje območja delovanja

26. Po potrebi je mogoče izvesti preskus za določanje območja delovanja, s katerim so pridobljene smernice za koncentracije/stopnje, ki bodo preskušane v dokončni študiji odziva v odvisnosti od odmerka. Pri preskusu za določanje območja delovanja morajo biti med vrednostmi preskusnih koncentracij/stopenj precejšnji razmiki (znašati morajo npr. 0,1, 1,0, 10, 100 in 1 000 mg/kg suhih tal). Koncentracije/stopnje pri fitofarmacevtskih sredstvih lahko temeljijo na največji koncentraciji ali stopnji aplikacije, npr. 1/100, 1/10, 1/1 priporočene največje koncentracije ali stopnje aplikacije.

Preskušanje z več koncentracijami/stopnjami aplikacije

27. Namen preskusa z več koncentracijami/stopnjami aplikacije je ugotoviti razmerje med odmerkom in odzivom ter določiti vrednost EC_x ali ER_x za vznik, biomaso in/ali vizualne učinke v primerjavi z neizpostavljenimi kontrolami, kot zahtevajo regulativni organi.

28. Število in razmiki koncentracij ali stopenj aplikacije morajo biti zadostni, da se ustvari zanesljivo razmerje med odmerkom in odzivom ter regresijska enačba in da se poda ocena vrednosti EC_x ali ER_x. Izbrane koncentracije/stopnje aplikacije morajo zajemati vrednosti EC_x ali ER_x, ki se bodo ugotavljale. Če je, na primer, zahtevana vrednost EC_{50}, je zaželeno preskušanje pri stopnjah, ki dosegajo od 20- do 80-odstotni učinek. Priporočeno število preskusnih koncentracij/stopenj aplikacij za doseganje tega je vsaj pet v

▼M6

geometrijski vrsti in še netretirana kontrola, faktor razmika med njimi pa ne sme biti večji kot tri. Za vsako tretirano ali kontrolno skupino mora biti število ponovitev vsaj štiri, skupno število semen pa vsaj 20. Za večjo statistično moč preskusa bo morda potrebnih več ponovitev določenih rastlin s slabo kalivostjo ali spremenljivo rastjo. Če se uporablja več preskusnih koncentracij/stopenj aplikacije, se lahko število ponovitev zmanjša. Če se ocenjuje vrednost NOEC, bo za doseganje želene statistične moči morda potrebnih več ponovitev (23).

Opažanja

29. Med obdobjem opazovanja, tj. od 14 do 21 dni po vzniku 50 % kontrolnih rastlin (tudi kontrol s topili, če je to smiselno), se pri rastlinah pogosto (vsaj tedensko in, če je mogoče, dnevno) opazuje, ali je prišlo do vznika, vidnih znakov fitotoksičnosti in umrljivosti. Ob koncu preskusa je treba zabeležiti meritev odstotka vznika in biomase preživelih rastlin ter vidne znake škodljivih učinkov na različne dele rastline. Med slednjimi so anomalije videza vzniknjenih sejancev, zakrnela rast, kloroza, razbarvanje, umrljivost in učinki na razvoj rastline. Končno biomaso je mogoče meriti s končno povprečno suho težo poganjkov preživelih rastlin, s spravilom poganjkov na površini tal in s sušenjem teh poganjkov pri 60 °C do konstantne teže. Namesto tega je končno biomaso mogoče meriti s svežo težo poganjkov. Če tako zahtevajo regulativni organi, je druga končna točka lahko višina poganjka. Za ocenjevanje opaznih strupenih učinkov je treba uporabljati enoten sistem točkovanja za vidne poškodbe. Primeri kvalitativnih in kvantitativnih vizualnih ocen so podani v virih (23)(24).

PODATKI IN POROČANJE

Statistična analiza

Preskus z eno samo koncentracijo/stopnjo

30. Podatke o vsaki rastlinski vrsti je treba analizirati z ustrezno statistično metodo (21). Treba je poročati o ravni učinka pri preskusni koncentraciji/stopnji ali nedoseganju danega učinka pri preskusni koncentraciji/stopnji (npr. o učinku, ki je < *x* % učinka, opaženega pri koncentraciji ali stopnji *y*).

Preskus z več koncentracijami/stopnjami

31. Z regresijsko enačbo se ugotovi razmerje med odmerkom in odzivom. Uporabljajo se lahko različni modeli: na primer, za oceno vrednosti EC_x ali ER_x (npr. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) in njenih meja zaupanja za vznik v obliki kvantnih podatkov so lahko primerne metode analiza logit in analiza probit, Weibullova metoda, metoda Spearman-Karber, prilagojena metoda Spearman-Karber itd. Za rast sejancev (težo in višino) kot zvezno končno točko je vrednost EC_x ali ER_x in njene meje zaupanja mogoče oceniti z ustrezno regresijsko analizo (npr. z Bruce-Versteegovo nelinearno regresijsko analizo (25)). Kadar je mogoče, mora biti R^2 za najbolj občutljive vrste enak ali večji od 0,7, uporabljene preskusne koncentracije/stopnje pa zajemajo od 20- do 80-odstotne učinke. Če se ocenjuje vrednost NOEC, mora imeti prednost uporaba učinkovitih statističnih preskusov, ki jih je treba izbrati na podlagi porazdelitve podatkov (21)(26).

Poročilo o preskusu

32. V poročilu o preskusu morajo biti predstavljeni rezultati študij in podroben opis preskusnih pogojev ter temeljita razprava o rezultatih, analiza podatkov in zaključki, izpeljani iz analize. Treba je podati povzetek v preglednici in izvleček rezultatov. Poročilo mora vključevati naslednje:

▼M6

Preskusna kemikalija:

— kemijski identifikacijski podatki, relevantne lastnosti preskušane kemikalije (npr. log P_{ow}, topnost v vodi, parni tlak in informacije o usodi in vedenju v okolju, če so na voljo),

— podrobnosti o pripravi preskusne raztopine in preverjanju preskusnih koncentracij, kot je navedeno v odstavku 18.

Preskusne vrste:

— podrobnosti preskusnega organizma: vrsta/sorta, družine rastlin, znanstvena in splošna imena, kar najpodrobneje opisana vir in zgodovina semena (npr. ime dobavitelja, odstotek kalivosti, velikost semena, številka razreda, serije ali skupine, leto ali rastna sezono pobiranja semena, datum ocene kalivosti), viabilnost itd.,

— število preskušanih vrst eno- in dvokaličnic,

— razlogi za izbiro vrste,

— opis shranjevanja, tretiranja in vzdrževanja semena.

Preskusni pogoji:

— oprema za preskušanje (npr. rastna komora, fitotron in rastlinjak),

— opis preskusnega sistema (npr. velikosti in materialov posod ter količine tal),

— lastnosti tal (tekstura ali vrsta tal: porazdelitev in razvrstitev delcev tal, fizikalne in kemijske lastnosti, vključno z odstotkom organske snovi, odstotek organskega ogljika in vrednost pH),

— priprava tal/substrata (npr. tal, umetnih tal, peska in drugega) pred preskusom,

— opis hranilnega gojišča, če je uporabljeno,

— nanos kemikalije: opis metode nanosa, opis opreme, stopnje in količine izpostavljenosti, vključno s preverjanjem kemikalije, opis metode umerjanja in opis okoljskih pogojev med nanosom,

— rastni pogoji: obsevanost (npr. PAR, fotosintetsko aktivno sevanje), obdobje osvetljenosti, največje/najmanjše temperature, program in metoda zalivanja, gnojenje,

— število semen na posodo, število rastlin na odmerek, število ponovitev (posod) na stopnjo izpostavljenosti,

— vrsta in število kontrol (negativnih in/ali pozitivnih kontrol, kontrole s topilom, če se uporablja),

— trajanje preskusa.

Rezultati:

— preglednica vseh končnih točk za vsako ponovitev, preskusno koncentracijo/stopnjo in vrsto,

— število in odstotek vzniknjenih semen v primerjavi s kontrolami,

— meritve biomase (suho težo ali svežo težo poganjkov) rastlin v obliki odstotka kontrol,

▼M6

— višina poganjkov rastlin v obliki odstotka kontrol, če je merjena,

— odstotek vidnih poškodb ter kvantitativni in kvalitativni opis vidnih poškodb (kloroza, nekroza, venenje, deformacije listov in stebel, pa tudi morebitna odsotnost učinkov) zaradi preskusne kemikalije v primerjavi s kontrolnimi rastlinami,

— opis ocenjevalne lestvice, uporabljene za presojo vidnih poškodb, če obstaja vizualno ocenjevanje,

— pri študijah z eno samo stopnjo je treba poročati o odstotku poškodb,

— vrednosti EC_x ali ER_x (npr. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) in z njimi povezane meje zaupanja. Če se izvaja regresijska analiza, je treba določiti standardno napako za regresijsko enačbo in standardno napako za ocene posameznih parametrov (npr. naklon, presek),

— vrednosti NOEC (in LOEC), če so izračunane,

— opis uporabljenih statističnih postopkov in predpostavk,

— grafični prikaz teh podatkov in razmerje med odmerkom in odzivom preskušanih vrst.

Odstopanja od postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, in morebitne nenavadne dogodke med preskusom.

LITERATURA

(1) Schrader, G., Metge, K., in Bahadir, M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189–193.

(2) Mednarodna organizacija za standardizacijo. (1993). ISO 11269-1. Kakovost tal – Določevanje učinka onesnažil na rastlinstvo – 1. del: Metoda merjenja zaviranja rasti korenin.

(3) Mednarodna organizacija za standardizacijo. (1995). ISO 11269-2. Kakovost tal – Določevanje učinka onesnažil na rastlinstvo – 2. del: Učinki kemikalij na vznik in rast višjih rastlin.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing,

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity,

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence),

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test,

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II,

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K. E., in Keddy, C. J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series, št. 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., in Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., št. 48.

(10) Hale, B., Hall, J. C., Solomon, K., in Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario, Kanada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) in Soil Sc. Soc. Amer. Ind. 26:305 (1962).

(12) Audus, L. J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. V: Audus, L. J., ur. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, poglavje 5, str. 163–206.

(13) Beall, M. L., Jr., in Nash, R. G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571–575.

(14) Beetsman, G. D., Kenney, D. R., in Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247–250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 str., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R. A., Wright, J. P., Honegger, J. L., in Warren, L. W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161– 1174.

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N., in Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349–369.

(18) Boutin, C. in Rogers, C. A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol. 9(4):255–271.

(19) Boutin, C., in Harper, J. L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155–271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T. E., Batchelor, S. P., in Maguire, R. J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532–2541.

(21) OECD (2006). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment, št. 54, Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(22) Hatzios, K. K., in Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1–63.

(23) Hamill, P. B., Marriage, P. B., in Friesen, G. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386–389.

(24) Frans, R. E., in Talbert, R. E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. V: B. Truelove (ur.) Research Methods in Weed Science, 2. izdaja. Southern weed Science Society, Auburn, 15–23.

(25) Bruce, R. D., in Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485– 1492.

(26) Poglavje C.33 te priloge: Preskus razmnoževanja deževnikov (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Aktivna sestavina (a.i.) (ali aktivna snov (a.s.)) je snov, zasnovana za doseganje določenega biološkega učinka (npr. nadzora nad insekti, preprečevanje bolezni rastlin, zatiranje plevela na tretiranem območju), ki je znana tudi kot aktivna sestavina oziroma snov na tehnični stopnji.

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

Fitofarmacevtska sredstva (sredstva za zaščito pridelka ali rastlin) ali pesticidi so snovi s posebno biološko aktivnostjo, ki se uporabljajo za zaščito pridelka pred škodljivimi organizmi (npr. glivičnimi boleznimi, insekti in kompetitivnimi rastlinami).

EC_x – koncentracija z x-odstotnim učinkom ali ER_x – stopnja z x-odstotnim učinkom je koncentracija ali stopnja, ki povzroči neželeno menjavo ali spremembo odstotka x v končni točki preskusa, merjeni glede na kontrolo (25- oziroma 50-odstotno zmanjšanje vznika, teže poganjkov, končnega števila prisotnih rastlin ali povečanje vidnih poškodb bi predstavljalo vrednost EC_{25}/ER_{25} oziroma EC_{50}/ER_{50}).

Vznik je pojav koleoptila ali kotiledona nad površino tal.

Formulacija je komercialno formulirani produkt, ki vsebuje aktivno snov (aktivno sestavino), znan tudi kot končni pripravek ([1]) ali značilni končni izdelek (TEP („typical end-use product“)).

Vrednost LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je bil opažen učinek. V tem preskusu ima koncentracija, ki ustreza vrednosti LOEC, v danem obdobju izpostavljenosti statistično značilen učinek ($p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo in je višja od vrednosti NOEC.

Neciljne rastline: rastline, ki so zunaj ciljnega območja rastlin. Pri fitofarmacevtskih sredstvih to navadno pomeni rastline zunaj tretiranega območja.

Vrednost NOEC (No Observed Effect Concentration) je najvišja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri ni bilo opaženega nobenega učinka. V tem preskusu koncentracija, ki ustreza vrednosti NOEC, v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$).

Fitotoksičnost: škodljiva odstopanja (ocenjena z meritvami in vizualno) od normalnega vzorca videza in rasti rastlin kot odziv na dano kemikalijo.

Ponovitev je preskusna enota, ki predstavlja kontrolno skupino in/ali tretirano skupino. V teh študijah je posoda opredeljena kot ponovitev.

Vizualna ocena: ocena vidnih poškodb na podlagi opazovanja rastlinskega sestoja, vitalnosti, deformacij, kloroze, nekroze in splošnega videza v primerjavi s kontrolo.

Preskusna kemikalija: katera koli snov ali zmes, preskušena s to metodo.

([1]) Končni pripravek: formulirani proizvod, ki vsebuje aktivno kemikalijo (aktivno sestavino) in se prodaja na trgu.

▼**M6**

Dodatek 2

Seznam vrst, uporabljenih pri preskušanju rastlin v preteklosti

Družina	Vrsta	Splošna imena
DICOTYLEDONAE (DVOKALIČNICE)		
Apiaceae (Umbelliferae) (kobulnice)	*Daucus carota*	korenje
Asteraceae (Compositae) (nebinovke (košarnice))	*Helianthus annuus*	sončnice
Asteraceae (Compositae) (nebinovke (košarnice))	*Lactuca sativa*	solata
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Sinapis alba*	bela gorjušica
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Brassica campestris* var. *chinensis*	kitajski kapus
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Brassica napus*	oljna ogrščica
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Brassica oleracea* var. *capitata*	zelje
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Brassica rapa*	strniščna repa
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Lepidium sativum*	kreša
Brassicaceae (Cruciferae) (križnice (kapusnice))	*Raphanus sativus*	redkev
Chenopodiaceae (metlikovke)	*Beta vulgaris*	sladkorna pesa
Cucurbitaceae (bučevke)	*Cucumis sativus*	kumara
Fabaceae (Leguminosae) (metuljnice (stročnice))	*Glycine max (G. soja)*	soja
Fabaceae (Leguminosae) (metuljnice (stročnice))	*Phaseolus aureus*	mungo fižol
Fabaceae (Leguminosae) (metuljnice (stročnice))	*Phaseolus vulgaris*	pritlikavi fižol, stročji fižol, vrtni fižol
Fabaceae (Leguminosae) (metuljnice (stročnice))	*Pisum sativum*	grah
Fabaceae (Leguminosae) (metuljnice (stročnice))	*Trigonella foenum-graecum*	božja rutica
metuljnice (stročnice) (Fabaceae (Leguminosae))	*Lotus corniculatus*	navadna nokota
metuljnice (stročnice) (Fabaceae (Leguminosae))	*Trifolium pratense*	črna detelja
metuljnice (stročnice) (Fabaceae (Leguminosae))	*Vicia sativa*	grašica
Linaceae (lanovke)	*Linum usitatissimum*	lan
Polygonaceae (dresnovke)	*Fagopyrum esculentum*	ajda
Solanaceae (razhudnikovke)	*Solanum lycopersicon*	paradižnik

▼**M6**

Družina	Vrsta	Splošna imena
MONOCOTYLEDONAE (ENOKALIČNICE)		
Liliaceae (Amarylladaceae) (lilijevke (narcisovke))	*Allium cepa*	čebula
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Avena sativa*	oves
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Hordeum vulgare*	ječmen
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Lolium perenne*	trpežna (angleška) ljuljka
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Oryza sativa*	riž
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Secale cereale*	rž
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Sorghum bicolor*	sirek v zrnju, navadni sirek
trave (Poaceae (Gramineae))	*Triticum aestivum*	pšenica
Poaceae (Gramineae) (trave)	*Zea mays*	koruza

▼M6

Dodatek 3

Seznam potencialnih nekmetijskih rastlin

Potencialne rastline za preskušanje strupenosti rastlin OECD.*Opomba:* V naslednji preglednici so informacije o 52 nekmetijskih vrstah (viri so za vsak vnos navedeni v oklepajih). Navedene hitrosti vznika so vzete iz objavljene literature in služijo le kot splošno vodilo. Posamezne izkušnje se lahko razlikujejo glede na vir semena in druge dejavnike.

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba ([1]) in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast ([2])	Globina sejanja (mm) ([3])	Čas do kalitve (dni) ([4])	Posebna tretiranja ([5])	Preskus strupenosti ([6])	Dobavitelji semen ([7])	Druge reference ([8])
APIACEAE (KOBULNICE) *Torilis japónica* (japonska oklobnica)	E, D; prizadeta območja, žive meje, pašniki (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	S = T (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	hladna stratifikacija (7, 14, 18, 19), morda je potrebno zorenje (19), tema zavira kalivost (1, 19), brez posebnih tretiranj (5)	NAKNADNO (5)		
ASTERACEAE (NEBINOVKE) *Bellis perennis* (navadna marjetica)	T travišča, orna zemljišča, trate (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	S = T (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	obsevanost ne vpliva na kalivost (18, 19), brez posebnih tretiranj (4, 14)	NAKNADNO (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (plavica)	E polja, obcestne površine, odprti habitati (16)	4,1–4,9 (4, 14)	S = T (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	brez posebnih tretiranj (2, 4)	NAKNADNO (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (črni glavinec)	T polja, obcestne površine, odprti habitati (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	S = T (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	morda je potrebno zorenje (18, 19), tema zavira kalivost (19), brez posebnih tretiranj (5, 14, 26)	NAKNADNO (5, 22, 26)	A	
Inula helenium veliki oman	T vlažna, prizadeta mesta (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		brez posebnih tretiranj (4)	NAKNADNO (4)	A, F	

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba ([1]) in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast ([2])	Globina sejanja (mm) ([3])	Čas do kalitve (dni) ([4])	Posebna tretiranja ([5])	Preskus strupenosti ([6])	Dobavitelji semen ([7])	Druge reference ([8])
Leontodon hispidus (navadni otavčič)	T polja, obcestne površine, prizadeta območja (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	S = T (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	tema zavira kalivost (17, 18, 19) brez posebnih tretiranj (5, 23)	NAKNADNO (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (srhkodlakava rudbekija)	D, T prizadeta območja (16)	0,3 (4, 14)	S = T (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	brez posebnih tretiranj (4, 14, 33)	NAKNADNO (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis kanadska zlata rozga	T pašniki, odprta območja (16)	0,06–0,08 (4, 14)	S = T (11)	0 (4)	14–21 (11)	zmešajte z enakim delom peska in 24 ur namakajte v 500 ppm GA (11), brez posebnih tretiranj (4)	NAKNADNO (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (pensilvanski bodič)	E polja, odprti habitati (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		tema lahko zavira kalivost (1), namakajte 12 ur v topli vodi (29)	PREDHODNO IN NAKNADNO (31)	A	
Xanthium spinosum (trnati bodič)	E odprti habitati (16)	200 (14)	S = T (14) S > T (6)	10 (6)		opraskanje (14), brez posebnih tretiranj (6)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6)	A	
Xanthium strumarium (navadni bodič)	E polja, odprti habitati (16)	67,4 (14)	S = T (14)	10–20 (6, 21)		brez posebnih tretiranj (6, 14, 21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE (KRIŽNICE) *Cardamine pratensis* (travniška penuša)	T polja, obcestne površine, trate (16, 19)	0,6 (14, 19)	S = T (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	tema zavira kalivost (18, 19), brez posebnih tretiranj (5, 14, 22)	NAKNADNO (5, 22)	F	

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba ([1]) in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast ([2])	Globina sejanja (mm) ([3])	Čas do kalitve (dni) ([4])	Posebna tretiranja ([5])	Preskus strupenosti ([6])	Dobavitelji semen ([7])	Druge reference ([8])
CARYOPHYLLACEAE (KLINČNICE) *Lychnis flos-cuculi* (kukavičja lučca)	T (16)	0,21 (14)	S = T (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	morda je potrebno zorenje (18), brez posebnih tretiranj (5, 14, 15, 22–26)	NAKNADNO (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE (METLIKOVKE) *Chenopodium album* (bela metlika)	E robovi polj, prizadeta območja (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	S = T (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	tretiranje se razlikuje glede na barvo semena (19), obdobje mirovanja pri shranjevanju na suhem (19), tema zavira kalivost (1, 18, 19), hladna stratifikacija (18), brez posebnih tretiranj (14, 34)	PREDHODNO IN NAKNADNO (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE (KRČNIČEVKE) *Hypericum perforatum* (šentjanževka)	T polja, orna zemljišča, odprti habitati (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	S = T (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	tema zavira kalivost (1, 18, 19), brez posebnih tretiranj (5, 14, 15, 25, 27)	NAKNADNO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE (SLAKOVKE) *Ipomoea hederacea* (bršljanasti lepi slak)	E obcestne površine, odprti habitati, koruzna polja (16)	28,2 (14)	S > T (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	obsevanost ne vpliva na kalivost (1), brez posebnih tretiranj (6, 21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE (OSTRIČEVKE) *Cyperus rotundus* (okrogla ostrica)	T orne površine, pašniki, obcestne površine (16, 30)	0,2 (14)	S = T (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	tema zavira kalivost (1), brez posebnih tretiranj (6, 10, 14)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE (METULJNICE) *Lotus corniculatus* (navadna nokota)	T travnate površine, obcestne površine, odprti habitati (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	S = T (14)		1 (50 %) (19)	opraskanje (14, 19), obsevanost ne vpliva na kalivost (18, 19) brez posebnih tretiranj (23, 25)	NAKNADNO (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba [1] in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast [2]	Globina sejanja (mm) [3]	Čas do kalitve (dni) [4]	Posebna tretiranja [5]	Preskus strupenosti [6]	Dobavitelji semen [7]	Druge reference [8]
Senna obtusifolia (topolistna sena)	E vlažni gozdovi (16)	23–28 (9)	S = T (14) S > T (9)	10–20 (6,9)		semena 24 ur namakajte v vodi (9), opraskanje (14), viabilnost semena se razlikuje glede na barvo (1), brez posebnih tretiranj (6)	NAKNADNO (6,9)	A	
Sesbania exaltata (konoplja)	E aluvialna tla (16)	11–13 (9, 14)	S > T (9)	10-20 (9, 21)		semena 24 ur namakajte v vodi (9), obsevanost ne vpliva na kalivost (1), brez posebnih tretiranj (21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (črna detelja)	T polja, obcestne površine, orna zemljišča (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	S = T (14)		1 (50 %) (19)	opraskanje (14, 18), morda je potrebno zorenje (19), obsevanost ne vpliva na kalivost (1, 19), brez posebnih tretiranj (5)	NAKNADNO (5)	A, E, F	
LAMIACEAE (USTNATICE) *Leonurus cardiaca* (deljenolistna srčnica)	T odprta območja (16)	0,75–1,0 (4, 14)	S = T (14)	0 (4)		brez posebnih tretiranj (4, 14)	NAKNADNO (4)	F	
Mentha spicata (klasasta meta)	T vlažna območja (16)	2,21 (4)		0 (4)		brez posebnih tretiranj (4)	NAKNADNO (4)	F	
Nepeta cataria (mačja meta)	T prizadeta območja (16)	0,54 (4, 14)	S = T (14)	0 (4)		brez posebnih tretiranj (2, 4, 14)	NAKNADNO (2,4)	F	

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba [1] in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast [2]	Globina sejanja (mm) [3]	Čas do kalitve (dni) [4]	Posebna tretiranja [5]	Preskus strupenosti [6]	Dobavitelji semen [7]	Druge reference [8]
Prunella vulgaris (navadna črnoglavka)	T orna zemljišča, travnata področja, prizadeta mesta (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	S = T (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	tema zavira kalivost (18, 19), boljša kalivost z večjimi semeni (1), brez posebnih tretiranj (4, 14, 22)	NAKNADNO (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (navadni čistec)	T travišča, robovi polj (19)	14–18 (14, 19)	S = T (14)		7 (50 %) (19)	brez posebnih tretiranj (5, 14, 22)	NAKNADNO (5, 22)	F	
MALVACEAE (SLEZENOVKE) *Abutilón theophrasti* (baržunasti oslezovec)	E polja, odprti habitati (16)	8,8 (14)	S = T (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	opraskanje (14), brez posebnih tretiranj (5, 10, 21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (bodičasta sida)	E polja, obcestne površine (16)	3,8 (14)	S = T (14)	10–20 (6, 21)		opraskanje (14), obsevanost ne vpliva na kalivost (1), brez posebnih tretiranj (6, 21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE (MAKOVKE) *Papaver rhoeas* (poljski mak)	E polja, orna zemljišča, prizadeta mesta (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	S = T (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	hladna stratifikacija in opraskanje (1, 19, 32), brez posebnih tretiranj (4, 14, 29)	NAKNADNO (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE (TRAVE) *Agrostis tenuis* (tankolistna šopulja)	trate, pašniki (16)	0,07 (14)	S > T (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	tema zavira kalivost (1, 17–19) brez posebnih tretiranj (10)	NAKNADNO (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (njivski lisičji rep)	E polja, odprti habitati (16)	0,9–1,6 (29, 34)	S = T (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	opraskanje (14), tretiranje s 101 mg/l KNO3 (14), topla stratifikacija (1), tema zavira kalivost (1), brez posebnih tretiranj (34)	PREDHODNO IN NAKNADNO (28, 34)	A	32

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba [1] in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast [2]	Globina sejanja (mm) [3]	Čas do kalitve (dni) [4]	Posebna tretiranja [5]	Preskus strupenosti [6]	Dobavitelji semen [7]	Druge reference [8]
Avena fatua (gluhi oves)	E kultivirana območja, odprti habitati (16)	7–37,5 (14, 30)	S = T (14) S > T (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	opraskanje (7, 32), tema zavira kalitev (1), hladna stratifikacija (1, 18), brez posebnih tretiranj (6, 10, 14)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (strešna stoklasa)	E polja, obcestne površine, orna zemljišča (16)	0,45–2,28 (14, 29)	S = T (14)	3 (29)		obdobje zorenja (1, 7, 32), svetloba zavira kalivost (1), brez posebnih tretiranj (14)	PREDHODNO IN NAKNADNO (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (navadni pasji rep)	T polja, obcestne površine, odprti habitati (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	S = T (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	obsevanost ne vpliva na kalivost (19), brez posebnih tretiranj (14, 29)	NAKNADNO (5)	A	
Digitaria sanguinalis (krvavordeča srakonja)	E polja, trate, odprti habitati (16)	0,52–0,6 (14, 30)	S = T (14)	10–20 (21).	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	opraskanje, hladna stratifikacija in zorenje (1, 7, 14, 32), tretiranje s 101 mg/l KNO3 (14), tema zavira kalivost (1), brez posebnih tretiranj (21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (navadna kostreba)	E (16)	1,5 (14)	S = T (14) S > T (3)	10–20 (7, 21)		opraskanje (7, 32), obsevanost ne vpliva na kalivost (1), brez posebnih tretiranj (3, 14, 21)	PREDHODNO IN NAKNADNO (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (kanadski bored)	T obrežna območja, prizadeta mesta (16)	4–5 (14, 30)	S = T (11)	1 (11)	14–28 (11)	brez posebnih tretiranj (2, 11)	NAKNADNO (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (travniška bilnica)	T polja, vlažna območja (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	S = T (14) S > T (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	brez posebnih tretiranj (10, 19)	NAKNADNO (10)	A	7

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba [1] in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast [2]	Globina sejanja (mm) [3]	Čas do kalitve (dni) [4]	Posebna tretiranja [5]	Preskus strupenosti [6]	Dobavitelji semen [7]	Druge reference [8]
Hordeum pusillum (mali ječmen)	E pašniki, obcestne površine, odprti habitati (16)	3,28 (14)				topla stratifikacija (1), obsevanost ne vpliva na kalivost (1)	PREDHODNO (31)		7
Phieum pratense (travniški mačji rep)	T pašniki, orna polja, prizadeta mesta (16, 19)	0,45 (14, 19)	S > T (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	tema zavira kalivost (19), obsevanost ne vpliva na kalivost (17), brez posebnih tretiranj (10, 14, 17, 19)	NAKNADNO (10)	A, E	
POLYGONACEAE (DRESNOVKE) *Polygonum convolvulus* (navadni slakovec)	E odprti habitati, obcestne površine (16)	5–8 (4, 14, 29)	S = T (20)	0–2 (4, 29)		hladna stratifikacija od 4 do 8 tednov (1, 2, 4, 20, 29), obsevanost ne vpliva na kalivost (1)	PREDHODNO IN NAKNADNO (1, 2, 20, 28, 31)	A	32
Polygonum lapathifolium (ščavjelistna dresen)	E vlažna tla (16)	1,8–2,5 (14).	S > T (6)		5 (94 %) (18)	obsevanost ne vpliva na kalivost (1), tema zavira kalivost (18), hladna stratifikacija (1), brez posebnih tretiranj (5)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (pensilvanska dresen)	E polja, odprti habitati (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		hladna stratifikacija 4 tedne pri 0–5 °C (1, 29), tema zavira kalivost (1)	PREDHODNO (31)	A, E	
Polygonum periscaria (breskvolistna dresen)	E prizadeta območja, orna zemljišča (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	S > T (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	opraskanje, hladna stratifikacija, tretiranje z GA (14), hladna stratifikacija, zorenje (17–19), tema zavira kalivost (19), brez posebnih tretiranj (13)	NAKNADNO (13)	A	32

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba ([1]) in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast ([2])	Globina sejanja (mm) ([3])	Čas do kalitve (dni) ([4])	Posebna tretiranja ([5])	Preskus strupenosti ([6])	Dobavitelji semen ([7])	Druge reference ([8])
Rumex crispus (kodrastolistna kislica)	T orna polja, obcestne površine, odprta območja (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	S = T (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	obsevanost ne vpliva na kalivost (18, 19), morda je potrebno zorenje (18), brez posebnih tretiranj (4, 14, 33)	NAKNADNO (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE (JEGLIČEVKE) *Anagallis arvensis* (navadna kurja češnjica)	E orna polja, odprta območja, prizadeta mesta (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	S = T (14)		1 (50 %) (19)	hladna stratifikacija, tretiranje z GA (1, 14, 18, 19, 32), za kalivost je potrebna svetloba (1), brez posebnih tretiranj (2, 4)	NAKNADNO (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE (ZLATIČEVKE) *Ranunculus acris* (ripeča zlatica)	T orna polja, obcestne površine, odprta območja (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	S = T (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	brez posebnih tretiranj (5, 14, 22, 24–26)	NAKNADNO (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE (ROŽNICE) *Geum urbanum* (navadna sretena)	T žive meje, vlažna območja (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	S = T (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	tema zavira kalivost (18, 19), topla stratifikacija (1), brez posebnih tretiranj (5, 14, 22, 25, 26)	NAKNADNO (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE (BROŠČEVKE) *Galium aparine* (plezajoča lakota)	E orna polja, vlažna območja, prizadeta mesta (16, 19)	7–9 (14, 19)	S = T (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	hladna stratifikacija (1, 18, 19), obsevanost ne vpliva na kalivost (18, 19), svetloba zavira kalivost (1), brez posebnih tretiranj (6, 14)	PREDHODNO IN NAKNADNO (6, 28)	A	32

▼M6

Botanično ime DRUŽINE vrste (slovensko splošno ime)	Življenjska doba ([1]) in habitat	Teža semena (mg)	Obdobje osvetljenosti za kalivost ali rast ([2])	Globina sejanja (mm) ([3])	Čas do kalitve (dni) ([4])	Posebna tretiranja ([5])	Preskus strupenosti ([6])	Dobavitelji semen ([7])	Druge reference ([8])
Galium mollugo (navadna lakota)	T žive meje, odprta območja (8)	7 (29)	S = T (14)	2 (29)		brez posebnih tretiranj (5, 14, 22, 24, 26, 29)	NAKNADNO (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE (ČRNOBINOVKE) *Digitalis purpurea* (škrlatni naprstec)	D, T žive meje, odprta območja (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	S = T (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	tema zavira kalivost (1,17–19), brez posebnih tretiranj (4, 22–26)	NAKNADNO (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (perzijski jetičnik)	E orna polja, odprta območja, prizadeta mesta (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	S = T (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	tema zavira kalivost (18, 19), hladna stratifikacija (18), brez posebnih tretiranj (14)	PREDHODNO IN NAKNADNO (28)	A	32

([1]) E = enoletnica, D = dvoletnica, T = trajnica.
([2]) Viri 11, 14 in 33 se nanašajo na razmerje svetlobe (S) in teme (T), potrebne za sprožitev kalitve semen. Viri 3, 6, 9, 10, 13 in 20 se nanašajo na rastne pogoje v rastlinjakih.
([3]) Oznaka 0 mm pove, da so bila semena posejana na površino tal ali da za kalitev potrebujejo svetlobo.
([4]) Navedene številke predstavljajo število dni, v katerih je odstotek semen glede na navedene vire vzkalil, npr. kaljenje 3 dni (50 %) (vir 19).
([5]) Podatki o trajanju zorenja in/ali stratifikaciji niso vedno na voljo. Temperaturni pogoji razen pri zahtevah hladnega tretiranja niso navedeni, saj je pri preskušanju v rastlinjakih omejen nadzor nad temperaturo. Večina semen bo pri običajnem nihanju temperatur v rastlinjakih vzkalila.
([6]) Označuje, ali je bila vrsta uporabljena v preskusu strupenosti rastline, ki je vključeval herbicide, pred vznikom (PREDHODNO) in/ali po vzniku (NAKNADNO).
([7]) Navaja primere komercialnih dobaviteljev semen.
([8]) Navaja dva alternativna vira, ki sta bila upoštevana.

▼**M6**

Navedeni dobavitelji semen

ID dobavitelja	Informacije o dobavitelju
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ VELIKA BRITANIJA + 44 1189349464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 ZDA +1 7273444050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 KANADA + 1 5195863985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 ZDA + 1 3034317333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 ZDA +1 8008733321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB VELIKA BRITANIJA +44 1229581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 KANADA + 1 8002747333 www.thompson-morgan.com

NAVEDENI VIRI

(1) Baskin, C. C., in Baskin, J. M. (1998). Seeds. Academic Press, Toronto.

(2) Blackburn, L. G., in Boutin, C. (2003). Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271–285.

(3) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T., Batchelor, P. S., in Maguire, R. J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532–2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., in Kjaer, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349–369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., in Butler, R. (1992). Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669–677.

(6) Brown, R. A., in Farmer, D. (1991). Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. V: Plants for toxicity assessment: 2. izdaja. ASTM STP 1115, J. W. Gorsuch, W. R. Lower, W. Wang, in M. A. Lewis, ur. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. Str. 197–208.

▼M6

(7) Buhler, D. D., in Hoffman, M. L. (1999). Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A. R., Tutin, T. G., in Warburg, E. F. (1981). Excursion flora of the British Isles, 3. izdaja, Cambridge University Press, Cambridge.

(9) Clay, P. A., in Griffin, J. L. (2000). Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481–486.

(10) Cole, J. F. H., in Canning, L. (1993). Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. str. 151–156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). (2004). Osebna komunikacija. (www.ernstseed.com).

(12) Fletcher, J. S., Johnson, F. L., in McFarlane, J. C. (1990). Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769–776.

(13) Fletcher, J. S., Pfleeger, T. G., Ratsch, H. C., in Hayes, R. (1996). Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189–1196.

(14) Flynn, S., Turner, R. M., in Dickie, J. B. (2004). Seed Information Database (release 6.0, okt. 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid).

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., in van der Eerden, L. J. M. (2001). Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21–28.

(16) Gleason, H. A., in Cronquist, A. (1991). Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2. izdaja. New York Botanical Garden, Bronx, NY.

(17) Grime, J. P. (1981). The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555–558.

(18) Grime, J. P., Mason, G., Curtis, A. V., Rodman, J., Band, S. R., Mowforth, M. A. G., Neal, A. M., in Shaw, S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017–1059.

(19) Grime, J. P., Hodgson, J. G., in Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London.

(20) Kjaer, C. (1994). Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34, 453–459.

(21) Klingaman, T. E., King, C. A., in Oliver, L. R. (1992). Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227–232.

(22) Marrs, R. H., Williams, C. T., Frost, A. J., in Plant, R. A. (1989). Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71–86.

(23) Marrs, R. H., Frost, A. J., in Plant, R. A. (1991). Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223–235.

(24) Marrs, R. H., Frost, A. J., in Plant, R. A. (1991). Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25–42.

(25) Marrs, R. H., Frost, A. J., Plant, R. A., in Lunnis, P. (1993). Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283–293.

▼**M6**

(26) Marrs, R. H., in Frost, A. J. (1997). A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369–388.

(27) Marshall, E. J. P., in Bernie, J. E. (1985). Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. str. 1021–1028.

(28) McKelvey, R. A., Wright, J. P., in Honegger, J. L. (2002). A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161–1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). (2004). Osebna komunikacija. (http://www.herbiseed.com).

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 ZDA.

(31) USEPA. (1999). One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R. H. (1979). Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L., in Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Osebna komunikacija.

(34) Zwerger, P., in Pestemer, W. (2000). Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711–718.

▼**M6**

Dodatek 4

Primeri ustreznih rastnih pogojev za določene vrste kmetijskih rastlin

Naslednji pogoji so se izkazali za primerne pri 10 vrstah kmetijskih rastlin in jih je mogoče uporabljati kot vodilo tudi pri preskusih z določenimi drugimi vrstami v rastnih komorah:

Koncentracija ogljikovega dioksida: 350 ± 50 ppm.

Relativna vlažnost: 70 ± 5 % med obdobji osvetljenosti in 90 ± 5 % med obdobji teme.

Temperatura: 25 ± 3 °C podnevi, 20 ± 3 °C ponoči.

Obdobje osvetljenosti: 16 ur osvetljenosti/8 ur teme, pri čemer se predpostavlja, da je povprečna valovna dolžina od 400 do 700 nm.

Osvetljenost: svetlost 350 ± 50 μE/m^2/s, merjeno na vrhu rastlinskega pokrova.

Vrste kmetijskih rastlin so:

— paradižnik (*Solanum lycopersicon*),

— navadna kumara (*Cucumis sativus*),

— solata (*Lactuca sativa*),

— soja (*Glycine max*),

— glavnato zelje (*Brassica oleracea var. capitata*),

— navadno korenje (*Daucus carota*),

— oves (*Avena sativa*),

— trpežna ljuljka (*Lolium perenne*),

— koruza (*Zea mays*),

— čebula (*Allium cepa*).

▼M6

C.32 PRESKUS RAZMNOŽEVANJA ENHITREJEV

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 220 (2004). Zasnovana je za uporabo pri ocenjevanju učinkov kemikalij na sposobnost razmnoževanja črva enhitreja, *Enchytraeus albidus* (Henle, 1873), v tleh. Načeloma temelji na metodi, ki jo je razvila nemška Zvezna agencija za okolje (1) in je bila preskušena s krožnim preskusom (2). Upoštevane so bile tudi druge metode za preskušanje strupenosti kemikalij za enhitreje in deževnike (3)(4)(5)(6)(7)(8).

ZAČETNI POMISLEKI

2. V tleh živeči kolobarniki iz rodu *Enchytraeus* so ekološko pomembna vrsta za ekotoksikološko preskušanje. Čeprav je enhitreje pogosto najti v tleh, ki vsebujejo deževnike, pa drži tudi to, da jih je pogosto veliko tudi v tleh, kjer deževnikov ni. Enhitreje je mogoče uporabljati v laboratorijskih preskusih ter v polterenskih in terenskih študijah. S praktičnega vidika je z mnogimi vrstami enhitrejev enostavno ravnati in jih gojiti, njihov generacijski čas pa je znatno krajši od generacijskega časa pri deževnikih. Zato preskus razmnoževanja z enhitreji traja le od 4 do 6 tednov, z deževniki (*Eisenia fetida*) pa 8 tednov.

3. Osnovne informacije o ekologiji in ekotoksikologiji enhitrejev v kopenskem okolju je mogoče najti v (9)(10)(11)(12).

NAČELO PRESKUSA

4. Odrasli črvi enhitrejev so izpostavljeni več koncentracijam preskusne kemikalije, vmešane v umetna tla. Preskus je mogoče razdeliti v dve fazi: (a) če na voljo ni dovolj informacij, preskus za določanje območja delovanja, v katerem je glavna končna točka smrtnost, ocenjena po dveh tednih izpostavljenosti, ter (b) dokončni preskus razmnoževanja, v katerem se oceni skupno število mladičev, ki jih je ustvaril starš, in preživetje staršev. Dokončni preskus traja šest tednov. Po prvih treh tednih se odrasli črvi odstranijo in zabeležijo se morfološke spremembe. Po dodatnih treh tednih se prešteje število potomcev, izleženih iz kokonov, ki so jih proizvedli starši. Sposobnost razmnoževanja živali, izpostavljenih preskusni kemikaliji, se za določitev (i) koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) in/ali (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) z regresijskim modelom, s katerim se oceni koncentracijo, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje sposobnosti razmnoževanja, primerja s sposobnostjo razmnoževanja pri kontrolah. Preskusne koncentracije morajo oklepati vrednost EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}), tako da vrednost EC_x nato izvira iz interpolacije in ne iz ekstrapolacije.

PODATKI O PRESKUSNI KEMIKALIJI

5. Po možnosti morajo biti znani topnost v vodi, vrednost log K_{ow}, porazdelitveni koeficient tla/voda (npr. poglavje C.18 ali C.19 te priloge) in parni tlak preskusne kemikalije. Zaželene so dodatne informacije o usodi preskusne kemikalije v tleh, kot so hitrosti fotolize in hidrolize.

6. To preskusno metodo je mogoče uporabiti za vodotopne in nevodotopne kemikalije. Vendar se bodo načini nanosa preskusne kemikalije ustrezno razlikovali. Preskusna metoda se ne sme uporabljati pri hlapnih kemikalijah, tj. kemikalijah, za katere je Henryjeva konstanta ali porazdelitveni koeficient zrak/voda večja od ena, ali pri kemikalijah, pri katerih parni tlak pri 25 °C presega 0,0133 Pa.

▼M6

VELJAVNOST PRESKUSA

7. Da preskus šteje kot veljaven, morajo kontrolni vzorci izpolnjevati naslednja merila:

— smrtnost pri odraslih osebkih na koncu preskusa za določanje območja delovanja in po prvih treh tednih po preskusu razmnoževanja ne sme presegati 20 %,

— s predpostavko, da je bilo pri pripravi preskusa uporabljenih 10 odraslih osebkov na posodo, mora biti na koncu preskusa povprečno ustvarjenih vsaj 25 mladičev,

— koeficient variacije okrog povprečnega števila mladičev ob koncu preskusa razmnoževanja ne sme presegati 50 %.

Če preskus ne uspe izpolniti zgoraj naštetih meril za veljavnost, mora biti prekinjen, razen če je mogoče podati utemeljitev za nadaljevanje preskusa. Utemeljitev mora biti vključena v poročilo o preskusu.

REFERENČNA KEMIKALIJA

8. Referenčna kemikalija mora biti preskušana v rednih časovnih razmikih ali pa po možnosti vključena v vsak preskus, da se preveri, ali se odziv preskusnih organizmov v času ni pomembneje spremenil. Primerna referenčna kemikalija je karbendazim, za katerega je dokazano, da vpliva na preživetje in razmnoževanje enhitrejev (13)(14), mogoče pa je uporabiti tudi druge kemikalije, katerih podatki o strupenosti so dobro znani. V krožnem preskusu je bila uporabljena formulacija karbendazima, znana pod trgovskim imenom Derosal™, ki jo dobavlja družba AgrEvo Company (iz Frankfurta v Nemčiji) in ki vsebuje 360 g/l (32,18 %) aktivne sestavine (2). Vrednost EC_{50} za razmnoževanje, določena v krožnem preskusu, je bila v območju 1,2 ± 0,8 mg aktivne sestavine (a.s.)/kg suhe mase (2). Če je v preskusno serijo vključen pozitivni toksikološki standard, se uporablja ena koncentracija, število ponovitev pa mora biti enako kot v kontrolah. Za karbendazim se priporoča preskušanje 1,2 mg a.s./kg suhe teže (preskušane v obliki tekoče formulacije).

OPIS PRESKUSA

Oprema

9. Preskusne posode morajo biti izdelane iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Primerni so stekleni kozarci (s prostornino npr. od 0,20 do 0,25 litra; premer: ≈ 6 cm). Posode morajo imeti prozorne pokrove (npr. iz stekla ali polietilena), ki so zasnovani tako, da čim bolj zmanjšajo izhlapevanje vode, pri tem pa omogočajo izmenjavo plinov med tlemi in ozračjem. Pokrovi morajo biti prozorni, da je omogočen prenos svetlobe.

10. Zahtevana je običajna laboratorijska oprema, zlasti naslednje:

— sušilna omara,

— stereomikroskop,

— merilnik vrednosti pH in fotometer,

— ustrezne natančne tehtnice,

— ustrezna oprema za uravnavanje temperature,

— ustrezna oprema za uravnavanje vlažnosti (ni nujna, če imajo posode za izpostavljanje pokrove),

— inkubator ali majhna soba s klimatsko napravo,

— pincete, kljuke ali zanke,

— kad za razvijanje fotografij.

Priprava umetnih tal

11. V tem preskusu se uporabljajo umetna tla (5)(7) z naslednjo sestavo (na podlagi suhih tež, posušenih na konstantno težo pri 105 °C):

▼**M6**

— 10 % na zraku posušenega in fino mletega šotnega mahu (sprejemljiva je velikost delcev 2 ± 1 mm); pred uporabo tal, pripravljenih s svežo šaržo šote, v preskusu je priporočljivo preveriti, ali so tla primerna za gojenje črvov,

— 20 % kaolinske gline (po možnosti naj bo vsebnost kaolinita nad 30 %),

— približno od 0,3 do 1,0 % kalcijevega karbonata ($CaCO_3$, zdrobljenega v prah, analitsko čistega) za doseganje vrednosti pH, ki znaša 6,0 ± 0,5; količina kalcijevega karbonata, ki bo dodana, je lahko odvisna zlasti od kakovosti/značilnosti šote,

— približno 70 % na zraku posušenega kremenovega peska (odvisno od potrebne količine $CaCO_3$), v glavnem finega peska z več kot 50 % delcev, ki merijo med 50 in 200 mikroni.

Pred uporabo tal v dokončnem preskusu je priporočljivo dokazati primernost umetnih tal za gojenje črvov in izpolnjevanje meril za veljavnost preskusa. Tako preverjanje je posebej priporočljivo za to, da se prepreči ogroženost preskusa, če se vsebnost organskega ogljika v umetnih tleh zniža, npr. z znižanjem vsebnosti mahu na vrednost 4–5 % in ustreznim zvišanjem vsebnosti peska. S takim znižanjem vsebnosti organskega ogljika se lahko zmanjšajo možnosti adsorpcije preskusne kemikalije na tla (organski ogljik), razpoložljivost preskusne kemikalije za črve pa se lahko poveča. Dokazano je, da lahko *Enchytraeus albidus* izpolnjuje merila za veljavnost v zvezi z razmnoževanjem, če se preskus izvaja z naravnimi tlemi z manjšo vsebnostjo organskega ogljika, npr. 2,7 % (15), (omejene) izkušnje pa kažejo, da je to mogoče doseči tudi pri umetnih tleh s 5 % šote.

Opomba: pri uporabi naravnih tal za dodatno preskušanje (na višjih stopnjah) je treba dokazati tudi primernost tal in izpolnjevanje meril za veljavnost preskusa.

12. Suhe sestavine tal se temeljito premešajo (npr. v velikem laboratorijskem mešalniku). To je treba storiti vsaj en teden pred začetkom preskusa. Zmešana tla je treba hraniti dva dneva, da se kislost uravnoteži/stabilizira. Za določanje vrednosti pH zmesi tal in 1 M kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M kalcijevega klorida ($CaCl_2$) se uporablja raztopina v razmerju 1: 5 (glej (16) in Dodatek 3). Če so tla bolj kisla, kot je določeno z zahtevanim območjem (glej odstavek 11), jih je mogoče prilagoditi z dodajanjem ustrezne količine $CaCO_3$. Če so tla preveč alkalna, jih je mogoče prilagoditi z dodajanjem večje količine zmesi, navedene v odstavku 11, vendar brez $CaCO_3$.

13. Največja zmogljivost zadrževanja vode (water holding capacity – WHC) umetnih tal je določena v skladu s postopki, opisanimi v Dodatku 2. Dan ali dva pred začetkom preskusa se suha umetna tla predhodno navlažijo z dodajanjem zadostne količine deionizirane vode, da je pridobljena približno polovica končne vsebnosti vode, kar je od 40 do 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode. Na začetku preskusa so predhodno navlažena tla razdeljena na dele, ki ustrezajo številu preskusnih koncentracij (in referenčnih

▼M6

kemikalij, kadar je primerno) ter kontrol, uporabljenih za preskus. Vsebnost vlage se z dodajanjem raztopine preskusne kemikalije in/ali z dodajanjem destilirane ali deionizirane vode prilagodi na 40–60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode (glej odstavke 19–21). Vsebnost vlage se določi na začetku in koncu preskusa (s sušenjem na konstantno težo pri 105 °C) in mora biti v optimalnem območju za preživetje črvov. Vsebnost vlage v tleh je mogoče preveriti z rahlim stiskanjem tal v roki; če je vsebnost vlage pravilna, se morajo med prsti pojaviti majhne kapljice vode.

Izbira in priprava preskusnih živali

14. Priporočena preskusna vrsta je *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837) (enhitrej), član družine Enchytraeidae (red Oligochaeta, deblo Annelida). *E. albidus* je ena od najobsežnejših vrst kolobarnikov iz družine Enchytraeidae, pri kateri so zabeleženi tudi osebki, dolgi do 35 mm (17)(18). Vrsta *E. albidus* je razširjena po vsem svetu in jo najdemo v morskih, sladkovodnih in kopenskih habitatih, v glavnem v razkrajajočih se organskih snoveh (algah, kompostu), redko pa na travnikih (9). Njena široka ekološka toleranca in nekatere morfološke variacije kažejo na to, da morda obstaja več podvrst.

15. Vrsta *E. albidus* je na trgu na voljo kot hrana za ribe. Treba je preveriti, ali je kultura kontaminirana z drugimi, običajno manjšimi vrstami (1)(19). V primeru kontaminacije je treba vse črve oprati z vodo v petrijevki. Nato se (s stereomikroskopom) izberejo veliki odrasli osebki *E. albidus* za pripravo nove kulture in izločitev vseh drugih črvov. Vrsto *E. albidus* je mogoče enostavno gojiti v mnogih organskih snoveh (glej Dodatek 4). Življenjski cikel vrste *E. albidus* je kratek, ker zrelost doseže v obdobju med 33 dnevi (pri 18 °C) in 74 dnevi (pri 12 °C) (1). Za preskus se uporabijo le kulture, ki so bile brez težav 5 tednov (v času ene generacije) gojene v laboratoriju.

16. Primerne so tudi druge vrste rodu Enchytraeus, npr. *E. buchholzi* (Vejdovsky, 1879) ali *E. crypticus* (Westheide in Graefe, 1992) (glej Dodatek 5). Če se uporabijo druge vrste rodu Enchytraeus, jih je treba jasno identificirati in poročati o razlogih za izbiro.

17. Živali, uporabljene v preskusih, so odrasli črvi. Na področju kliteluma morajo imeti jajčeca (bele pike) in biti morajo približno enake velikosti (dolgi približno 1 cm). Sinhronizacija gojitvene kulture ni potrebna.

18. Če se enhitreji ne gojijo v isti vrsti tal in v pogojih (vključno s hranjenjem), uporabljenih za končni preskus, jih je treba aklimatizirati vsaj 24 ur in do tri dni. Na začetku je treba aklimatizirati število odraslih osebkov, ki je večje od števila, potrebnega za izvedbo preskusa, da je omogočena možnost zavrnitve poškodovanih ali kako drugače neprimernih osebkov. Ob koncu obdobja aklimatizacije se za preskus izberejo samo črvi, ki imajo jajčeca in se ne vedejo nenormalno (npr. ne poskušajo uiti iz tal). Črvi se s pinceto, s kljukami ali z zankami skrbno izberejo in namestijo v petrijevko, v kateri je malo sladke vode. V ta namen je primernejša rekonstituirana sladka voda, kot je predlagano v poglavju C.20 te priloge (Preskus razmnoževanja vrste *Daphnia magna*), saj deionizirana, demineralizirana ali vodovodna voda lahko črve poškoduje. Črvi se pregledajo pod stereomikroskopom in izločijo se vsi, ki nimajo jajčec. Pazljivo se odstranijo in izločijo vse pršice ali vsi skakači, ki so morda kontaminirali kulture. Zdravi črvi, ki se ne uporabijo za preskus, se vrnejo v založno kulturo.

▼M6

Priprava preskusnih koncentracij

Preskusna kemikalija, topna v vodi

19. Raztopina preskusne kemikalije se pripravi v deionizirani vodi v količini, ki zadošča za vse ponovitve ene preskusne koncentracije. Priporočljivo je uporabljati zadostno količino vode, da se doseže zahtevana vsebnost vlage, tj. od 40 do 60 % največje vrednosti WHC (glej odstavek 13). Pred vstavljanjem v preskusno posodo se vsaka raztopina preskusne kemikalije temeljito zmeša z eno šaržo predhodno navlaženih tal.

Preskusna kemikalija, ki ni topna v vodi

20. Pri kemikalijah, ki niso topne v vodi, so pa topne v organskih topilih, se lahko preskusna kemikalija raztopi v najmanjši mogoči količini primernega vehikla (npr. acetona). Uporabijo se lahko le hlapna topila. Vehikel se razprši na majhno količino (npr. 2,5 g) finega kremenovega peska ali pa se z njo zmeša. Vehikel se odstrani tako, da vsaj eno uro izhlapeva v digestoriju. Ta zmes kremenovega peska in preskusne kemikalije se doda predhodno navlaženim tlom in po dodajanju ustrezne količine deionizirane vode temeljito zmeša, da se doseže zahtevana vlaga. Končna mešanica se namesti v preskusne posode.

21. Pri kemikalijah, ki so slabo topne v vodi in organskih topilih, se ekvivalent 2,5 g fino mletega kremenovega peska na preskusno posodo zmeša z določeno količino preskusne kemikalije, da nastane želena preskusna koncentracija. Ta zmes kremenovega peska in preskusne kemikalije se doda predhodno navlaženim tlom in po dodajanju ustrezne količine deionizirane vode temeljito zmeša, da se doseže zahtevana vsebnost vlage. Končna mešanica se porazdeli v preskusne posode. Postopek se ponovi za vsako preskusno koncentracijo, pripravi pa se tudi ustrezna kontrola.

22. Kemikalij se običajno ne sme preskušati pri koncentracijah, večjih od 1 000 mg/kg suhe mase tal. Vendar pa je v skladu s cilji določenega preskusa morda potrebno preskušanje pri višjih koncentracijah.

IZVEDBA PRESKUSOV

Preskusne in kontrolne skupine

23. Za vsako preskusno koncentracijo se količina preskusnih tal, ki ustreza 20 g suhe teže, postavi v preskusno posodo (glej odstavke 19–21). Pripravijo se tudi kontrolni vzorci brez preskusne kemikalije. Vsaki posodi se v skladu s postopki, opisanimi v odstavku 29, doda hrana. V vsako preskusno posodo se naključno razporedi po deset črvov. Črvi se previdno prenesejo v vsako preskusno posodo in na primer s pinceto, kljukami ali zankami namestijo na površino tal. Število ponovitev za preskusne koncentracije in za kontrolne vzorce je odvisno od uporabljenega načrta preskusa (glej odstavek 34). Preskusne posode se naključno namestijo v preskusni inkubator, njihovi položaji pa se naključno menjajo vsak teden.

24. Če se za nanos preskusne kemikalije uporablja vehikel, je treba poleg preskusne serije izvesti še eno kontrolno serijo, ki vsebuje kremenov pesek, na katerega se razprši ali z njim zmeša topilo. Koncentracija topila ali disperzijskega sredstva mora biti enaka tisti v preskusnih posodah s preskusno kemikalijo. Za kemikalije, ki jih je treba dodajanje v skladu s postopki, opisanimi v odstavku 21, se mora izvesti kontrolna serija, ki vsebuje dodaten kremenov pesek (2,5 g na posodo).

▼M6

Preskusni pogoji

25. Preskusna temperatura je 20 ± 2 °C. Za preprečevanje uhajanja črvov iz tal se preskus izvaja v nadzorovanih ciklih svetlobe in teme (po možnosti 16 ur svetlobe in 8 ur teme) pri osvetljenosti od 400 do 800 luksov na območju preskusnih posod.

26. Za preverjanje vlažnosti tal se posode na začetku preskusa in nato enkrat tedensko stehtajo. Izguba mase se nadomesti z dodajanjem ustrezne količine deionizirane vode. Treba je opozoriti, da je mogoče izgubo vode zmanjšati z vzdrževanjem visoke relativne vlažnosti zraka (> 80 %) v preskusnem inkubatorju.

27. Vsebnost vlage in vrednost pH je treba meriti ob začetku in koncu preskusa za določanje območja delovanja in dokončnega preskusa. Meritve je treba opraviti v kontrolnih in tretiranih (z vsemi koncentracijami) vzorcih tal, ki so pripravljeni in vzdrževani na enak način kot preskusne kulture, ne vsebujejo pa črvov. Tem vzorcem tal je treba hrano dodati le v začetku preskusa, da se spodbudi mikrobna dejavnost. Količina dodane hrane mora biti enaka količini hrane, dodani preskusnim kulturam. Tem posodam med preskusom ni treba dodajati dodatne hrane.

Hranjenje

28. Uporablja se hrana, ki lahko vzdržuje populacijo enhitrejev. Kot primerna hrana so se izkazali ovseni kosmiči, po možnosti avtoklavirani pred uporabo, da se prepreči kontaminacija z mikrobi (primerno je tudi gretje).

29. Najprej se hrana ponudi tako, da se 50 mg grobo mletih ovsenih kosmičev zmeša s tlemi v vsaki posodi, še preden se vanjo namestijo črvi. Nato pa se hrana dobavlja tedensko, vse do 21. dneva. Hranjenje se 28. dne ne izvede, saj so odrasli osebki na tej stopnji odstranjeni, mladi črvi pa po tem potrebujejo relativno malo dodatne hrane. Hranjenje med preskusom obsega 25 mg grobo mletih ovsenih kosmičev na posodo, ki se previdno namestijo na površino tal, da ne poškodujejo črvov. Za zmanjšanje rasti gliv je treba kosmiče ovsa prekriti z majhno količino tal in jih tako zakopati v tla. Če hrana ostane nepoužita, je treba obrok zmanjšati.

Načrt za preskus za določanje območja delovanja

30. Po potrebi se preskus za določanje območja delovanja izvede na primer s petimi koncentracijami preskusnih kemikalij, ki znašajo 0,1, 1,0, 10, 100 in 1 000 mg/kg (suhe teže tal). Zadošča ena ponovitev za vsak tretirani in kontrolni vzorec.

31. Preskus za določanje območja delovanja traja dva tedna. Na koncu preskusa se oceni smrtnost črvov. Črv se zabeleži kot mrtev, če se na sprednjem koncu ne odziva na mehanske dražljaje. Pri odločanju o območju koncentracij za uporabo v dokončnem preskusu so poleg informacij o smrtnosti lahko koristne tudi dodatne informacije. Zato je treba zabeležiti tudi spremembe vedenja odraslih osebkov (npr. nezmožnost kopanja v tla, negibno ležanje ob stekleni steni preskusne posode) in morfologijo (npr. prisotnost odprtih ran) ter morebitno prisotnost mladičev. Slednjo je mogoče določiti z metodo barvanja, opisano v Dodatku 6.

32. Vrednost LC_{50} je mogoče približno določiti z izračunom geometrijske sredine podatkov o smrtnosti. Pri določanju razpona koncentracij za dokončni preskus se predpostavlja, da so učinki na razmnoževanje nižji od vrednosti LC_{50} za faktor, ki znaša do 10. Vendar je to razmerje empirično in je v vsakem posameznem primeru lahko drugačno. Dodatna

▼M6

opažanja iz preskusa za določanje območja delovanja, kot je pojav mladičev, lahko pripomorejo k natančnejši določitvi razpona koncentracij preskusne kemikalije, ki bo uporabljen v dokončnem preskusu.

33. Za natančno določitev vrednosti LC_{50} je priporočljivo izvajanje preskusa z vsaj štirimi ponovitvami vsake od koncentracij preskusne kemikalije in število koncentracij, ki je zadostno, da pri teh koncentracijah povzroči vsaj štiri različne statistično značilne povprečne odzive. Podobno število koncentracij in ponovitev za kontrole se uporablja, kadar je to primerno.

Načrt dokončnega preskusa razmnoževanja

34. Na podlagi priporočil, ki izhajajo iz krožnega preskusa, se predlagajo trije načrti (2).

— Za določanje vrednosti NOEC je treba preskusiti vsaj pet koncentracij v geometrijski vrsti. Priporočene so štiri ponovitve za vsako preskusno koncentracijo in osem kontrol. Med koncentracijami mora biti razmik, katerega faktor ne sme presegati vrednosti 1,8.

— Za določitev vrednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) je treba preskusiti vsaj pet koncentracij, da se lahko EC_x določi z interpolacijo in ne z ekstrapolacijo pa morajo koncentracije oklepati vrednost EC_x. Priporočene so vsaj štiri ponovitve za vsako preskusno koncentracijo in štiri kontrolne ponovitve. Faktor razmika se lahko spreminja, tj. je v pričakovanem območju učinkov lahko manjši ali enak 1,8, pri višjih in nižjih koncentracijah pa je lahko nad 1,8.

— Kombiniran pristop omogoča določitev vrednosti NOEC in ECx. Treba je uporabiti osem koncentracij za tretiranje v geometrijski vrsti. Priporočene so štiri ponovitve za vsako tretiranje in osem kontrol. Med koncentracijami mora biti razmik, katerega faktor ne sme presegati vrednosti 1,8.

35. Treba je uporabiti deset odraslih črvov na preskusno posodo (glej odstavek 23). V preskusno posodo se hrana doda na začetku preskusa in nato enkrat tedensko (glej odstavek 29) do vključno 21. dneva. Na 21. dan se vzorci tal previdno ročno pregledajo; poiščejo in preštejejo se živi odrasli črvi ter zabeležijo spremembe vedenja (npr. nezmožnost kopanja v tla, negibno ležanje ob stekleni steni preskusne posode) in morfologije (npr. odprte rane). Nato se vsi odrasli črvi odstranijo iz preskusnih posod in preskusnih tal. Preskusna tla, ki vsebujejo morebitne ustvarjene kokone, se inkubirajo dodatne tri tedne pri enakih preskusnih pogojih, razen hranjenja, ki poteka le 35. dan (tj. 25 mg grobo mletih ovsenih kosmičev na posodo).

36. Po šestih tednih se preštejejo črvi, ki so se na novo izlegli. Priporočljiva je metoda, ki temelji na barvanju z barvilom bengal rdeče (glej Dodatek 6), čeprav so se kot primerne izkazale tudi druge tehnike ekstrakcije z vlago (ne pa tudi s toploto) in flotacije (glej Dodatek 6) (4)(10)(11)(20). Barvanje z barvilom bengal rdeče je priporočljivo, ker ekstrakcijo iz substrata tal z vlago lahko ovira motnost zaradi delcev suspendirane gline.

Mejni preskus

37. Če pri največji koncentraciji v preskusu za določanje območja delovanja (tj. 1 000 mg/kg) ni opaženih učinkov, je mogoče preskus razmnoževanja s koncentracijo 1 000 mg/kg izvesti kot mejni preskus, da se dokaže, da je vrednost NOEC za razmnoževanje večja od te vrednosti.

▼**M6**

Povzetek in časovni razpored preskusa

38. Faze preskusa je mogoče povzeti na naslednji način:

Čas	Preskus za določanje območja delovanja	Dokončni preskus
dan – 7 ali prej	— priprava umetnih tal (mešanje suhih sestavin)	— priprava umetnih tal (mešanje suhih sestavin)
dan – 5	— preverjanje vrednosti pH umetnih tal — merjenje največje vrednosti WHC tal	— preverjanje vrednosti pH umetnih tal — merjenje največje vrednosti WHC tal
od dne – 5 do dne – 3	— razvrščanje črvov za aklimatizacijo	— razvrščanje črvov za aklimatizacijo
od dne – 3 do dne 0	— aklimatizacija črvov vsaj 24 ur	— aklimatizacija črvov vsaj 24 ur
dan – 1	— predhodna navlažitev umetnih tal in razdelitev v šarže	— predhodna navlažitev umetnih tal in razdelitev v šarže
dan 0	— priprava založnih raztopin — nanos preskusne kemikalije — odtehtanje preskusnega substrata v preskusne posode — primešanje hrane — vnašanje črvov — merjenje vrednosti pH in vsebnosti vlage v tleh	— priprava založnih raztopin — nanos preskusne kemikalije — odtehtanje preskusnega substrata v preskusne posode — primešanje hrane — vnašanje črvov — merjenje vrednosti pH in vsebnosti vlage v tleh
dan 7	— preverjanje vsebnosti vlage v tleh	— preverjanje vsebnosti vlage v tleh — hranjenje
dan 14	— določitev smrtnosti odraslih osebkov — ocena števila mladičev — merjenje vrednosti pH in vsebnosti vlage v tleh	— preverjanje vsebnosti vlage v tleh — hranjenje
dan 21		— opazovanje vedenja odraslih osebkov — odstranjevanje odraslih osebkov — določitev smrtnosti odraslih osebkov — preverjanje vsebnosti vlage v tleh — hranjenje
dan 28		— preverjanje vsebnosti vlage v tleh — brez hranjenja
dan 35		— preverjanje vsebnosti vlage v tleh — hranjenje
dan 42		— štetje mladih črvov — merjenje vrednosti pH in vsebnosti vlage v tleh

▼M6

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

39. Čeprav je v Dodatku 7 podan pregled, v tej preskusni metodi ni podana nobena dokončna statistična smernica za analizo rezultatov preskusa.

40. V preskusu za določanje območja delovanja je glavna končna točka smrtnost. Vendar je treba zabeležiti tudi spremembe vedenja odraslih osebkov (npr. nezmožnost kopanja v tla, negibno ležanje ob stekleni steni preskusne posode) in morfologije (npr. odprte rane) ter morebitno prisotnost mladičev. Za določanje vrednosti LC_{50} se običajno uporabi analiza probit (21) ali regresija logit. Vendar pa je mogoče v primerih, pri katerih ta analitska metoda ni primerna (npr. če so na voljo manj kot tri koncentracije z delnimi usmrtitvami), uporabiti alternativne metode. Te metode lahko vključujejo drseča povprečja (22), prilagojeno metodo Spearman-Karber (23) ali enostavno interpolacijo (npr. geometrijsko sredino vrednosti LC_0 in LC_{100}, izračunano s kvadratnim korenom zmnožka vrednosti LC_0 in LC_{100}).

41. V dokončnem preskusu je končna točka plodnost (tj. število ustvarjenih mladičev). Vendar je treba v končno poročilo, tako kot pri preskusu za določanje območja delovanja, zabeležiti vse druge znake škodljivega delovanja. Za statistično analizo morata biti izračunana aritmetična sredina in standardni odklon za razmnoževanje pri posamezni tretirani skupini in kontroli.

42. Če je izvedena analiza variance, je mogoče standardni odklon, s, in stopinje prostosti, df, nadomestiti z oceno skupne variance, pridobljene z analizo variance (ANOVA) oziroma z njenimi stopinjami prostosti, če varianca ni odvisna od koncentracije. V tem primeru uporabite enosmerne analize variance kontrol in tretiranih skupin. Te vrednosti se navadno izračunajo s komercialno programsko opremo za statistiko, pri čemer so rezultati glede na posodo uporabljeni kot ponovitve. Če se zdi, da je združevanje podatkov za negativne kontrole in kontrole s topilom bolj smiselno od preskušanja glede na enega od njih, jih je treba preskusiti, da se preveri, da med njimi ni značilnih razlik (za ustrezne preskuse glej odstavek 45 in Dodatek 7).

43. Nadaljnje statistično preskušanje in sklepanje je odvisno od tega, ali so vrednosti ponovitev normalno porazdeljene in homogene glede na svojo varianco.

Ocena vrednosti NOEC

44. Prednost mora imeti uporaba učinkovitih preskusov. Uporabiti je treba informacije npr. iz predhodnih izkušenj s krožnim preskušanjem ali druge podatke iz preteklih študij o tem, ali so podatki približno normalno porazdeljeni. Homogenost variance (homoskedastičnost) je bolj kritična. Izkušnje kažejo, da varianca pogosto narašča z naraščajočo srednjo vrednostjo. V teh primerih transformacija podatkov lahko privede do homoskedastičnosti. Vendar mora taka transformacija temeljiti na izkušnjah s podatki iz preteklih študij in ne na podatkih, ki se proučujejo. Pri homogenih podatkih je treba izvesti več t-preskusov, kot je Williamsov preskus ($\alpha = 0{,}05$, enostranski) (24)(25) ali, v nekaterih primerih, Dunnettov preskus (26)(27). Velja pripomniti, da je treba v primeru neenake ponovitve popraviti vrednosti t iz preglednice tako, kot sta predlagala Dunnett in Williams. Včasih se odzivi zaradi velike variacije ne povečajo/zmanjšajo pravilno. V tem primeru velikega odklona od monotonosti je bolj primeren Dunnettov preskus. Če obstajajo odkloni od homoskedastičnosti, je morda smiselno natančneje proučiti

▼M6

možne učinke na variance, da se ugotovi, ali je mogoče uporabiti t-preskuse brez prevelike izgube učinkovitosti (28). Druga možnost je uporaba večkratnega U-preskusa, npr. Bonferronijevega U-preskusa po Holmu (29), ali – če ti podatki kažejo heteroskedastičnost, sicer pa so skladni z osnovnim monotonim razmerjem odmerek-odziv – drugega neparametričnega preskusa (npr. preskusa po Jonckheere-Terpstraju (30)(31) ali Shirleyjevega preskusa (32)(33)); uporaba takšnega preskusa ima v splošnem prednost pred t-preskusi za neenake variance. (Glej tudi shemo v Dodatku 7.)

45. Če je izveden mejni preskus in so izpolnjeni predpogoji za postopke parametričnih preskusov (normalnost, homogenost), je mogoče uporabiti parni Studentov t-preskus ali, namesto tega, postopek Mann-Whitneyjevega U-preskusa (29).

Ocena vrednosti EC_x

46. Za izračun katere koli vrednosti EC_x se po pridobitvi ustrezne funkcije odmerek-odziv za regresijsko analizo (linearno ali nelinearno) uporabijo srednje vrednosti glede na tretirano skupino. Za rast črvov v obliki zveznega odziva je mogoče vrednosti EC_x oceniti z ustrezno regresijsko analizo (35). Med primernimi funkcijami za kvantne podatke (smrtnost/preživetje in število ustvarjenih potomcev) so normalna sigmoidna funkcija in logistične ali Weibullove funkcije, ki vsebujejo od dva do štiri parametre, pri čemer nekatere lahko modelirajo tudi odzive v obliki hormeze. Če je bila funkcija odmerek-odziv prilagojena z linearno regresijsko analizo, je treba v regresijski analizi pred ocenjevanjem vrednosti EC_x najti značilni r^2 (determinacijski koeficient) in/ali naklon, tako da se v enačbo, podano z regresijsko analizo, vstavi vrednost, ki ustreza x % srednje vrednosti kontrole. V skladu s Fiellerjem (navedeno v Finney (21)) ali z drugimi ustreznimi sodobnimi metodami se izračunajo 95-odstotne meje zaupanja.

47. Namesto tega se odziv lahko modelira kot odstotek ali razmerje parametra modela, ki se razlaga kot srednja vrednost odziva kontrole. V teh primerih je mogoče običajno (logistično, Weibullovo) sigmoidno krivuljo pogosto enostavno prilagoditi rezultatom s postopkom regresije probit (21). V teh primerih je treba utežno funkcijo prilagoditi za odzive metrik, kot je podano v Christensen (36). Če pa je ugotovljena hormeza, mora analizo probit nadomestiti logistična ali Weibullova funkcija s štirimi parametri, prilagojena s postopkom nelinearne regresije (36). Če podatkom ni mogoče prilagoditi primerne funkcije odmerek-odziv, je mogoče za oceno vrednosti EC_x in njenih meja zaupanja uporabiti alternativne metode, kot so drseča povprečja po Thompsonu (22) in postopek prilagojene metode Spearman-Karber (23).

POROČILO O PRESKUSU

48. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— fizikalno stanje in, kjer je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti (npr. topnost v vodi, parni tlak),

— kemijski identifikacijski podatki preskusne kemikalije po nomenklaturi IUPAC, številka CAS, serija, skupina, strukturna formula in čistost,

— datum izteka roka uporabnosti vzorca.

Preskusne vrste:

— uporabljene preskusne vrste: vrsta, znanstveno ime, vir organizmov in pogoji gojenja.

Preskusni pogoji:

— sestavine in priprava umetnih tal,

▼M6

— metoda uporabe preskusne kemikalije,

— opis preskusnih pogojev, vključno s temperaturo, vsebnostjo vlage, vrednostjo pH itd.,

— celoten opis načrta in postopkov poskusa.

Rezultati preskusa:

— smrtnost pri odraslih črvih po dveh tednih in število mladičev na koncu preskusa za določanje območja delovanja,

— smrtnost pri odraslih črvih po treh tednih izpostavljenosti in celoten seznam mladičev na koncu dokončnega preskusa,

— morebitni opaženi fizični ali patološki simptomi in spremembe vedenja pri preskusnih organizmih,

— vrednosti LC_{50}, NOEC in/ali EC_x (npr. EC_{50}, EC_{10}) za razmnoževanje, če je mogoče nekatere od njih uporabiti znotraj intervalov zaupanja, krivulja prilagojenega modela, uporabljena za njegov izračun, ter vse informacije in opažanja, ki pripomorejo k razlagi rezultatov.

Odstopanja od postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, in morebitni nenavadni dogodki med preskusom.

LITERATURA

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J., in Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 str.

(3) Westheide, W., in Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, V: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Uredila Esser, G., in Overdieck, D., str. 497–508. Elsevier, Amsterdam.

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., in Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport, št. 719102025. 46 str.

(5) Poglavje C.8 te priloge, Strupenost za deževnike.

(6) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, št. 11268-1. ISO, Ženeva.

(7) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Ženeva.

(8) Rundgren, S., in A. K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). V: Løkke, H. in C. A. M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73–94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217–232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246–249.

(11) Dunger, W., in Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W. A. M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2–29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19–24.

(14) Römbke, J., in Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79–96.

(15) Römbke, J., Riepert, F., in Achazi, R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen. V: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W., in Eisentraeger A. (ur.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(16) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1994). Kakovost tal – Določevanje pH, št. 10390. ISO, Ženeva.

(17) Bell, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902, 1– 13.

(18) Nielsen, C. O., in Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1– 160.

(19) Bouguenec, V., in Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9–22.

(20) Korinkova, J., in Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.

(21) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3. izdaja), str. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. -Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M. A., Russo, R. C., in Thurston, R.V. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355–361.

(29) Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133– 145.

(31) Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327–333.

(32) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144– 151.

▼**M6**

(33) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183– 186.

(34) Sokal, R. R., in F. J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2. izdaja. W. H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213–221.

(36) Van Ewijk, P. H., in Hoekstra, J. A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve:

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

EC_x (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki na preskusnih organizmih v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolno učinkuje x-odstotno. V tem preskusu so učinkovite koncentracije izražene kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal.

LC_0 (koncentracija brez smrtnega učinka) je koncentracija preskusne kemikalije, ki v določenem časovnem obdobju ne ubije nobenega od izpostavljenih preskusnih organizmov. V tem preskusu je LC_0 izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal.

LC_{50} (srednja smrtna koncentracija) je koncentracija preskusne kemikalije, ki v določenem časovnem obdobju ubije 50 % izpostavljenih preskusnih organizmov. V tem preskusu je LC_{50} izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal.

LC_{100} (popolnoma smrtna koncentracija) je koncentracija preskusne kemikalije, ki v določenem časovnem obdobju ubije 100 % izpostavljenih preskusnih organizmov. V tem preskusu je LC_{100} izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal.

LOEC (najnižja koncentracija z opaznim učinkom) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki ima statistično značilen učinek ($p < 0,05$). V tem preskusu je vrednost LOEC izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal. Vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC morajo običajno kazati učinek, ki je statistično različen od kontrole. Vsa odstopanja od zgoraj navedenega pri ugotavljanju vrednosti LOEC morajo biti utemeljena v poročilu o preskusu.

NOEC (koncentracija brez opaznega učinka) je najvišja koncentracija preskusne kemikalije tik pod vrednostjo LOEC, pri kateri ni opaznega učinka. V tem preskusu koncentracija, ki ustreza vrednosti NOEC, v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$).

Hitrost razmnoževanja je srednja vrednost števila mladih črvov, ki jih ustvari določeno število odraslih osebkov v preskusnem obdobju.

Preskusna kemikalija je katera koli snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M6

Dodatek 2

Določanje največje zmogljivosti zadrževanja vode

Določanje zmogljivosti zadrževanja vode umetnih tal

Ugotovljeno je bilo, da je primerna naslednja metoda. Opisana je v Prilogi C standarda ISO DIS 11268-2.

S primerno napravo (svedrastim vzorčevalnikom itd.) zberite določeno količino (npr. 5 g) substrata preskusnih tal. Pokrijte dno vzorčevalnika s koščkom filtrirnega papirja in ga po polnjenju z vodo postavite na stojalo v vodno kopel. Vzorčevalnik je treba postopoma potapljati, dokler nivo vode ni nad zgornjim delom tal. Nato ga je treba pustiti v vodi približno tri ure. Ker ni mogoče zadržati vse vode, ki jo absorbirajo talne kapilare, mora biti omogočeno, da se vzorec tal dve uri suši, tako da se vzorčevalnik postavi na ležišče iz zelo mokrega, fino mletega kremenovega peska, ki je nameščen v zaprti posodi (da se ne posuši). Nato je treba vzorec stehtati in pri 105 °C posušiti na konstantno maso. Zmogljivost zadrževanja vode (WHC) je nato mogoče izračunati po naslednjem postopku:

$$\text{WHC (v \% suhe mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

pri čemer je:

S = z vodo nasičeni substrat + masa vzorčevalnika + masa filtrirnega papirja,

T = tara (masa vzorčevalnika + masa filtrirnega papirja),

D = suha masa substrata.

VIR:

ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, št. 11268-2, ISO, Ženeva.

▼**M6**

Dodatek 3

Določanje vrednosti ph tal

Naslednja metoda za določanje vrednosti pH vzorca tal temelji na opisu v ISO 10390 (Kakovost tal – Določevanje pH).

Določena količina tal se pri sobni temperaturi suši vsaj 12 ur. Nato se izdela suspenzija tal (ki vsebuje vsaj 5 gramov tal) v petkratni količini volumna tal z 1 M analitsko čistega kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M raztopine analitsko čistega kalcijevega klorida ($CaCl_2$). Suspenzija se nato pet minut temeljito stresa. Po stresanju se suspenzija vsaj 2 uri in največ 24 ur pusti, da se usede. Vrednost pH tekoče faze se nato meri z merilnikom vrednosti pH, ki je pred vsako meritvijo umerjen z ustreznimi vrstami pufrskih raztopin (npr. pH 4,0 in 7,0).

VIR:

ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1994). Kakovost tal – Določevanje pH, št. 10390. ISO, Ženeva.

▼M6

Dodatek 4

Pogoji gojenja vrste *enchytraeus*

Enhitreje vrste *Enchytraeus albidus* (in drugih vrst *Enchytraeus*) je mogoče gojiti v velikih plastičnih posodah (npr. 30 × 60 × 10 cm), napolnjenih z zmesjo 1: 1 umetnih tal in naravne, nekontaminirane vrtne prsti. Kompostnemu materialu se je treba izogibati, saj lahko vsebuje strupene kemikalije, kot so težke kovine. Pred uporabo je treba iz tal odstraniti favno (npr. z globokim zamrzovanjem). Substrat, ki ga sestavljajo samo umetna tla, je tudi mogoče uporabiti, vendar je lahko hitrost razmnoževanja nižja od tiste pri substratu z mešanimi tlemi. Vrednost pH substrata, uporabljenega za gojenje, mora znašati 6,0 ± 0,5.

Kultura se hrani v temi pri temperaturi od 15 do 20 °C ± 2 °C. Izogibati se je treba temperaturam, višjim od 23 °C. Tla je treba ohranjati vlažna, ne pa mokra. Da je vsebnost vlage pravilna, kažejo majhne kapljice vode, ki se pojavijo med prsti ob rahlem stiskanju tal. Treba se je izogibati ustvarjanju anoksičnih pogojev, zato je treba poskrbeti, da pokrovi posod, v katerih so kulture, omogočajo zadostno izmenjavo plinov z ozračjem. Vsak teden je treba tla previdno prekopati, da se pospeši zračenje.

Črve je mogoče hraniti z ovsenimi kosmiči. Ovseni kosmiči morajo biti shranjeni v zatesnjenih posodah, pred uporabo pa jih je treba avtoklavirati ali segreti, da se prepreči kontaminacija s pršicami iz moke (npr. vrstami *Glyzyphagus*, *Astigmata*, *Acarina*) ali plenilskimi pršicami (npr. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Po segrevanju je treba hrano zmleti, tako da jo je mogoče enostavno potresti po površini tal. Občasno se lahko ovsenim kosmičem dodajo vitamini, mleko in ribje olje. Druga primerna vira hrane sta pekovski kvas in ribja hrana „Tetramin“.

Hranjenje poteka približno dvakrat tedensko. Ustrezno količino ovsenih kosmičev se potrese na površino tal ali ob prekopavanju tal za pospeševanje zračenja previdno vmeša v substrat. Absolutna količina ponujene hrane je odvisna od števila črvov v substratu. Če je bila vsa hrana použita v istem dnevu, kot je bila ponujena, je to lahko vodilo, da je treba količino hrane povečati. Obratno pa je treba, če hrana v času drugega hranjenja (en teden kasneje) še vedno ostaja na površini, količino zmanjšati. Hrano, kontaminirano z glivami, je treba odstraniti in zamenjati. Po treh mesecih je treba črve prenesti v sveže pripravljen substrat.

Pogoji gojenja veljajo za zadovoljive, če: (a) črvi ne skušajo zapustiti substrata tal, (b) se črvi skozi tla premikajo hitro, (c) imajo svetlečo zunanjo površino, na katero se ne lepijo delci, (d) so bolj ali manj bele barve, (e) so v kulturah črvi različnih starostnih obdobij, (f) se neprestano razmnožujejo.

▼M6

Dodatek 5

Izvedba preskusa pri drugih vrstah *enchytraeus*

Izbira vrst

Razen vrste *E. albidus* je mogoče uporabiti tudi druge vrste, vendar je treba preskusni postopek in merila za veljavnost ustrezno prilagoditi. Ker je veliko vrst *Enchytraeus* lahko dostopnih in jih je mogoče zadovoljivo gojiti v laboratoriju, je najpomembnejše merilo za izbiro drugih vrst, ne vrste *E. albidus*, ekološka pomembnost in, dodatno, primerljiva občutljivost. Lahko obstajajo tudi uradni razlogi za spremembo vrste. V državah, v katerih se npr. vrsta *E. albidus* ne pojavlja in je ni mogoče uvoziti (npr. zaradi omejitev v zvezi s karanteno), je treba uporabiti drugo vrsto *Enchytraeus*.

Primeri ustreznih alternativnih vrst

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide in Graefe, 1992): v zadnjih letih se ta vrsta pogosto uporablja v ekotoksikoloških študijah, ker jo je preprosto gojiti in preskušati. Vendar je majhna, zato je ravnanje z njo težje v primerjavi z vrsto *E. albidus* (še posebej v fazah pred uporabo metode barvanja). Ni zagotovo dokazano, da vrsta *E. crypticus* obstaja na polju, opisana je bila le na podlagi kultur deževnikov. Zato njene ekološke potrebe niso znane.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879): to ime verjetno zajema skupino vrst v bližnjem sorodstvu, ki jih je morfološko težko ločiti. Ni priporočena za uporabo pri preskušanju, dokler ni ugotovljeno, kateri vrsti pripadajo posamezni osebki, uporabljeni v preskusu. *E. buchholzi* je navadno mogoče najti na travnikih in prizadetih območjih, kot so obcestne površine.

— *Enchytraeus luxuriosus*: ta vrsta je bila prvotno znana kot *E.* „*minutus*“, a je bila nedavno opisana (1). Prvič jo je odkril U. Graefe (iz Hamburga) na travniku blizu St. Peter-Ordinga (Schleswig-Holstein, Nemčija). *E. luxuriosus* je približno pol manjša od vrste *E. albidus*, a je večja od drugih tu opisanih vrst; ta vrsta bi lahko bila dobra alternativa vrsti *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen in Christensen, 1963): doslej so o tej vrsti poročali, da so jo našli v nemških in španskih mineralnih tleh, kjer je pogosta, vendar ne v velikem obsegu. V primerjavi z drugimi vrstami tega rodu jo je relativno enostavno določiti. O njenem vedenju v laboratorijskih preskusih ali njeni občutljivosti na kemikalije ni ničesar znanega. Vendar pa je bilo ugotovljeno, da jo je enostavno gojiti (E. Belotti, osebna komunikacija).

Pogoji gojenja

Vse zgoraj omenjene vrste *Enchytraeus* je mogoče gojiti v enakih substratih, kot se uporabljajo za vrsto *E. albidus*. Njihova manjša velikost pomeni, da so posode za gojenje lahko manjše in da je mogoče uporabiti enako hrano, vendar pa je treba prilagoditi velikost obroka. Življenjski cikel teh vrst je krajši od življenjskega cikla vrste *E albidus*, zato mora biti hranjenje pogostejše.

Preskusni pogoji

Preskusni pogoji so v splošnem enaki kot tisti za vrsto *E. albidus*, razen naslednjega:

— velikost preskusne posode je lahko manjša (ni pa nujno),

— trajanje preskusa razmnoževanja je lahko (ni pa nujno) krajše, tj. štiri namesto šest tednov, vendar trajanja preskusa za določanje območja delovanja ni dovoljeno spremeniti,

— za štetje je zaradi majhnosti mladih črvov zelo priporočljiva metoda barvanja,

— merilo za veljavnost, ki se nanaša na „število mladičev na preskusno posodo v kontrolnem vzorcu“, je treba spremeniti v „50“.

▼**M6**

VIR

(1) Schmelz, R. M., in Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93–100.

▼M6

Dodatek 6

Podroben opis tehnik ekstrakcije

Barvanje z barvilom bengal rdeče

To metodo, ki je bila najprej razvita v ekologiji celinskih voda (1), je za štetje mladih enhitrejev v preskusu razmnoževanja enhitrejev naprej predlagal W. de Coen (z Univerze v Gentu, Belgija). Neodvisno od njega so prilagojeno različico (barvilo bengal rdeče, zmešano s formaldehidom namesto z etanolom) razvili na inštitutu RIVM v Bilthovnu (2)(3).

Ob koncu dokončnega preskusa (tj. po šestih tednih) se tla iz preskusnih posod prenesejo v plitko posodo. Za ta namen je uporabna posoda Bellaplast ali kad za razvijanje fotografij z rebrastim dnom; slednja zato, ker „rebra“ omejujejo premikanje črvov v polju opazovanja. Mladiči se fiksirajo z etanolom (s približno 5 ml na ponovitev). Posode se napolnijo z vodo do višine od 1 do 2 cm. Doda se nekaj kapljic (od 200 do 300 µl) barvila bengal rdeče (1-odstotna raztopina v etanolu) (alternativa je 0,5-odstotno barvilo eozin), obe sestavini pa se previdno zmešata. Po 12 urah bi morali biti črvi obarvani rdečkasto in bi jih moralo biti enostavno prešteti, ker bodo ležali na površini substrata. Zmes substrata/alkohola je namesto tega mogoče pred štetjem črvov sprati tudi prek sita (velikost mreže: 0,250 mm). S tem postopkom se bo nekaj kaolinita, šote in peska izpralo, rdečkasto obarvane črve pa bo laže videti in prešteti. Štetje olajšajo tudi osvetljene leče (leče velikosti vsaj 100 × 75 mm s faktorjem povečave od 2 do 3).

S tehniko barvanja se čas štetja skrajša na nekaj minut na posodo, kot vodilo pa lahko služi podatek, da bi morala ena oseba oceniti vse posode iz enega preskusa v največ dveh dneh.

Ekstrakcija z vlago

Ekstrakcijo z vlago je treba začeti takoj po koncu preskusa. Tla iz vsake preskusne posode se namestijo na plastična sita z velikostjo mreže približno 1 mm. Sita se nato obesijo v plastične sklede, tako da se ne dotikajo tal. Sklede se previdno polnijo z vodo, dokler vzorci v sitih niso popolnoma pod površino vode. Da se zagotovi stopnja izkoristka, ki znaša več kot 90 % prisotnih črvov, je treba uporabiti obdobje ekstrakcije 3 dni pri 20 ± 2 °C. Na koncu obdobja ekstrakcije se sita odstranijo in voda (razen majhne količine) se počasi odlije, pri čemer je treba paziti, da se ne kali usedlina na dnu skled. Plastične sklede se nato rahlo pretresejo, da se suspendira usedlina v vodi nad usedlino. Voda se prenese v petrijevko, ko pa se delci tal usedejo, je s stereomikroskopom in kleščami iz mehkega jekla mogoče določiti, odstraniti in prešteti enhitreje.

Flotacija

Metodo, ki temelji na flotaciji, je v opombi opisal R. Kuperman (4). Po fiksiranju vsebine preskusne posode z etanolom se tla poplavijo z disperzijo Ludox (koloidni kremen AM-30, suspenzija v vodi 30 % mase), ki naj sega od 10 do 15 mm nad površino tal. Po temeljitem mešanju tal s flotacijskim sredstvom od 2 do 3 minute je mogoče mlade črve, ki plavajo na površini, enostavno prešteti.

VIRI

(1) Korinkova, J., in Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., in Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport, št. 719102025. 46 str.

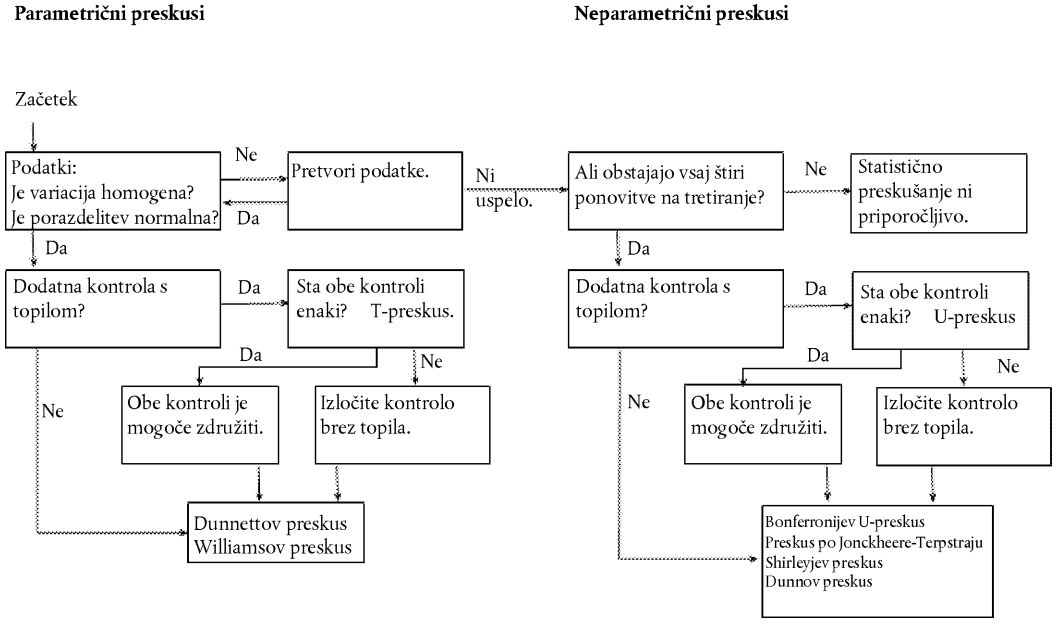
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R. P. M., in Dirven-Van Breemen, E. M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108–121.

(4) Phillips, C. T., Checkai, R. T., in Kuperman, R. G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, ZDA. Abstract Book No. PMP069, str. 157.

▼**M6**

Dodatek 7

Pregled statistične ocene podatkov (določitev vrednosti noec)



▼M6

C.33 **PRESKUS RAZMNOŽEVANJA DEŽEVNIKOV (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 222 (2004). Zasnovana je za uporabo pri ocenjevanju učinkov kemikalij v tleh na sposobnost razmnoževanja (in druge subletalne končne točke) vrste deževnikov *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) ali *Eisenia andrei* (Andre, 1963) (1) (2). Preskus je bil krožno preskušen (3). Obstaja preskusna metoda za preskus akutne strupenosti pri deževnikih (4). Objavljenih je več drugih mednarodnih in nacionalnih smernic za preskuse akutne in kronične strupenosti za deževnike (5)(6)(7)(8).

2. Vrsta *Eisenia fetida/Eisenia andrei* velja za eno od predstavnic talne favne in še posebej deževnikov. Na voljo so osnovne informacije o ekologiji deževnikov in njihovi uporabi pri ekotoksikološkem preskušanju (7)(9)(10)(11)(12).

NAČELO PRESKUSA

3. Odrasli črvi so izpostavljeni več koncentracijam preskusne kemikalije, vmešane v tla ali, v primeru pesticidov, nanesene na tla ali v tla s postopki, skladnimi z vzorcem uporabe kemikalije. Način nanosa je odvisen od namena preskusa. Območje preskusnih koncentracij je izbrano tako, da zajema subletalne in smrtne učinke v obdobju osmih tednov. Smrtnost in učinki na rast odraslih črvov so določeni po 4 tednih izpostavljenosti. Odrasli osebki se nato odstranijo iz tal in po nadaljnjih 4 tednih se s štetjem potomcev ocenijo učinki na razmnoževanje. Sposobnost razmnoževanja živali, izpostavljenih preskusni kemikaliji, se za določitev (i) koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) in/ali (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) z regresijskim modelom, s katerim se oceni koncentracijo, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje sposobnosti razmnoževanja, primerja s sposobnostjo razmnoževanja pri kontrolah. Preskusne koncentracije morajo oklepati vrednost EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}), tako da vrednost EC_x nato izvira iz interpolacije in ne iz ekstrapolacije (za opredelitve glej Dodatek 1).

PODATKI O PRESKUSNI KEMIKALIJI

4. Za pomoč pri zasnovi ustreznih preskusnih postopkov morajo biti na voljo naslednji podatki v zvezi s preskusno kemikalijo:

— topnost v vodi,

— log K_{ow},

— parni tlak

— ter informacije o usodi in vedenju v okolju, kadar je mogoče (npr. hitrost fotolize in hitrost hidrolize, če sta pomembni za vzorce uporabe).

5. To preskusno metodo je mogoče uporabiti pri vseh kemikalijah, ne glede na njihovo topnost v vodi. Preskusna metoda se ne sme uporabljati pri hlapnih kemikalijah, ki so tu opredeljene kot kemikalije, za katere je Henryjeva konstanta ali porazdelitveni koeficient zrak/voda večja od ena, ali pri kemikalijah, pri katerih parni tlak pri 25 °C presega 0,0133 Pa.

6. V tej preskusni metodi ni upoštevana morebitna razgradnja preskusne kemikalije v obdobju preskusa. Zato ni mogoče predpostavljati, da bodo koncentracije izpostavljenosti med celotnim preskusom ostale na začetnih vrednostih. V tem primeru je priporočena kemijska analiza preskusne kemikalije na začetku in koncu preskusa.

▼M6

REFERENČNA KEMIKALIJA

7. Za zagotovitev, da so laboratorijski preskusni pogoji ustrezni, in za potrditev, da se odziv preskusnih organizmov skozi čas statistično ne spreminja, je treba določiti vrednost NOEC in/ali ECx referenčne kemikalije. Referenčno kemikalijo je priporočljivo preskusiti najmanj enkrat letno oz. vzporedno z določanjem strupenosti preskusne snovi, kadar se preskušanja opravljajo redkeje. Karbendazim ali benomil sta primerni referenčni kemikaliji, za kateri je dokazano, da vplivata na reprodukcijo (3). Značilne učinke je treba opaziti med (a) 1 in 5 mg aktivne sestavine (a.s.)/kg suhe mase ali (b) 250–500 g/ha ali 25–50 mg/m^2. Če je v preskusno serijo vključen pozitivni toksikološki standard, se uporablja ena koncentracija, število ponovitev pa mora biti enako kot v kontrolah.

VELJAVNOST PRESKUSA

8. Da rezultat preskusa šteje kot veljaven, morajo kontrolni vzorci izpolnjevati naslednja merila:

— vsaka ponovitev (ki vključuje 10 odraslih osebkov) ob koncu preskusa ustvari ≥ 30 mladičev,

— koeficient variacije razmnoževanja je ≤ 30 %,

— smrtnost pri odraslih osebkih v začetnih 4 tednih preskusa je ≤ 10 %.

Če preskus ne uspe izpolniti zgoraj naštetih meril za veljavnost, mora biti prekinjen, razen če je mogoče podati utemeljitev za nadaljevanje preskusa. Utemeljitev mora biti vključena v poročilo.

OPIS PRESKUSA

Oprema

9. Uporabiti je treba eno- ali dvolitrske preskusne posode iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Površina prečnega prereza posod mora biti približno 200 cm^2, tako da globina vlažnega substrata doseže 5–6 cm, ko je dodanih od 500 do 600 g suhe mase substrata. Zasnova posode mora omogočati izmenjavo plinov med substratom in ozračjem ter dostop svetlobe (npr. s perforiranim prozornim pokrovom), pri tem pa mora črvom preprečevati pobeg. Če je substrata znatno več od 500 do 600 g na preskusno posodo, je treba število črvov sorazmerno povečati.

10. Zahtevana je običajna laboratorijska oprema, posebej naslednje:

— sušilnik,

— stereomikroskop,

— merilnik vrednosti pH in fotometer,

— ustrezne natančne tehtnice,

— ustrezna oprema za uravnavanje temperature,

— ustrezna oprema za uravnavanje vlažnosti (ni nujna, če imajo posode za izpostavljanje pokrove),

— inkubator ali majhna soba s klimatsko napravo,

— pincete, kljuke ali zanke,

— vodna kopel.

▼M6

Priprava umetnih tal

11. V tem preskusu so uporabljena umetna tla (5)(7) z naslednjo sestavo (na podlagi suhih tež, posušenih na konstantno maso pri 105 °C):

— 10 odstotkov šotnega mahu (z vrednostjo pH, ki je čim bližje vrednostim od 5,5 do 6,0, brez vidnih ostankov rastlin, posušenega na izmerjeno vsebnost vlage),

— 20 odstotkov kaolinske gline (po možnosti naj bo vsebnost kaolinita nad 30 odstotki),

— od 0,3 do 1,0 % kalcijevega karbonata ($CaCO_3$, zdrobljenega v prah, analitsko čistega) za doseganje začetne vrednosti pH 6,0 ± 0,5,

— 70 % na zraku posušenega kremenovega peska (odvisno od potrebne količine $CaCO_3$), v glavnem finega peska z več kot 50 % delcev, ki merijo med 50 in 200 mikroni.

Opomba 1: potrebna količina $CaCO_3$ bo odvisna od sestavin substrata tal, vključno s hrano, in jo je treba določiti z merjenjem podvzorcev tal tik pred preskusom. Vrednost pH je merjena v zmešanem vzorcu v 1 M raztopine kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M raztopine kalcijevega klorida ($CaCl_2$) (13).*Opomba 2:* vsebnost organskega ogljika v umetnih tleh je mogoče znižati, npr. z znižanjem vsebnosti šote na vrednost 4–5 % in ustreznim zvišanjem vsebnosti peska. S takim znižanjem vsebnosti organskega ogljika se lahko zmanjšajo možnosti adsorpcije preskusne kemikalije na tla (organski ogljik), razpoložljivost preskusne kemikalije za črve pa se lahko poveča. Dokazano je, da lahko *Eisenia fetida* izpolnjuje merila za veljavnost v zvezi z razmnoževanjem, če se preskus izvaja z naravnimi tlemi z manjšo vsebnostjo organskega ogljika (npr. 2,7 %) (14), izkušnje pa kažejo, da je to mogoče doseči tudi pri umetnih tleh s 5 % šote. Zato pred uporabo takih tal v dokončnem preskusu ni nujno dokazovati, ali so umetna tla primerna za omogočanje skladnosti preskusa z merili za veljavnost, razen če je vsebnost šote znižana bolj, kot je določeno zgoraj.*Opomba 3:* pri uporabi naravnih tal za dodatno preskušanje (na višjih stopnjah) je treba dokazati tudi primernost tal in izpolnjevanje meril za veljavnost preskusa.

12. Suhe sestavine tal se v dobro prezračenem prostoru temeljito premešajo (npr. v velikem laboratorijskem mešalniku). Pred začetkom preskusa se suha umetna tla navlažijo z dodajanjem zadostne količine deionizirane vode, da je pridobljene približno polovico končne vsebnosti vode, kar je od 40 do 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode (kar ustreza vrednosti 50 ± 10 % suhe mase vlage). S tem je ustvarjen substrat, iz katerega med stiskanjem v roki ne izloči stoječa ali prosto tekoča voda. Največja zmogljivost zadrževanja vode (WHC) umetnih tal je določena v skladu s postopki, opisanimi v Dodatku 2, standardu ISO 11274 (15) ali enakovrednem standardu EU.

13. Če je preskusna kemikalija nanesena na površino tal ali vmešana v tla brez vode, je mogoče končno količino vode v umetna tla vmešati med pripravo tal. Če se preskusna kemikalija vmeša v tla skupaj z nekaj vode, je mogoče dodatno količino vode dodati skupaj s preskusno kemikalijo (glej odstavek 19).

14. Vsebnost vlage v tleh je določena ob začetku in koncu preskusa v skladu s standardom ISO 11465 (16) ali enakovrednim standardom EU, vrednost pH tal pa v skladu z Dodatkom 3 ali standardom ISO 10390 (13) ali enakovrednim standardom EU. Te določitve je treba izvesti v vzorcu kontrolnih

▼M6

tal in vzorcih tal s posameznimi preskusnimi koncentracijami. Ob preskušanju kislih ali bazičnih kemikalij vrednosti pH ni dovoljeno prilagajati. Med celotnim preskusom je treba vsebnost vlage spremljati z rednim tehtanjem posod (glej odstavka 26 in 30).

Izbira in priprava preskusnih živali

15. Vrsta, uporabljena v preskusu, je *Eisenia fetida* ali *Eisenia andrei* (1)(2). Za začetek preskusa so potrebni odrasli črvi v starosti od dveh mesecev do enega leta, ki imajo klitelum. Črve je treba izbrati iz sinhronizirane kulture z relativno homogeno starostno strukturo (Dodatek 4). Razlika v starosti posameznih osebkov v preskusni skupini ne sme biti večja od 4 tednov.

16. Izbrane črve je treba vsaj en dan aklimatizirati v vrsti substrata umetnih tal, ki bo uporabljena v preskusu. V tem obdobju je treba črve hraniti z enako hrano, kot bo uporabljena v preskusu (glej odstavke od 31 do 33).

17. Na začetku preskusa je treba posamezne skupine 10 črvov stehtati in jih naključno dodeliti preskusnim posodam. Pred tehtanjem se črvi operejo (z deionizirano vodo), odvečna voda pa se odstrani tako, da se črvi za kratek čas položijo na filtrirni papir. Mokra masa posameznih črvov mora znašati med 250 in 600 mg.

Priprava preskusnih koncentracij

18. Uporabita se lahko dve metodi nanosa preskusne kemikalije: vmešanje preskusne kemikalije v tla (glej odstavke 19–21) ali nanos na površino tal (glej odstavke 22–24). Izbira ustrezne metode je odvisna od namena preskusa. V splošnem se priporoča vmešanje preskusne kemikalije v tla. Vendar so morda potrebni postopki nanosa, ki so skladni z običajno kmetijsko prakso (npr. pršenje tekoče formulacije ali uporaba posebnih formulacij pesticidov, kot so zrnca ali obloge semen). Topila, ki se uporabljajo kot pomoč pri tretiranju tal s preskusno kemikalijo, je treba izbrati na podlagi njihove nizke stopnje strupenosti za deževnike, v načrt preskusa pa je treba vključiti ustrezno kontrolo s topilom (glej odstavek 27).

Vmešanje preskusne kemikalije v tla

Preskusna kemikalija, topna v vodi

19. Raztopina preskusne kemikalije v deionizirani vodi se pripravi tik pred začetkom preskusa v količini, ki zadošča za vse ponovitve ene preskusne koncentracije. Za lažjo pripravo preskusne raztopine je morda potrebno pomožno topilo. Priročno je pripraviti količino raztopine, ki je potrebna za doseganje končne vsebnosti vlage (od 40 do 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode). Raztopino je treba pred vstavljanjem v preskusno posodo temeljito zmešati s tlemi.

Preskusna kemikalija, ki ni topna v vodi

20. Preskusna kemikalija se raztopi v majhni količini primernega organskega topila (npr. acetona) in se nato razprši na majhno količino finega kremenovega peska ali pa se vanjo vmeša. Vehikel se nato odstrani tako, da vsaj nekaj minut izhlapeva v digestoriju. Tretirani pesek se nato temeljito zmeša s predhodno navlaženimi umetnimi tlemi. Nato se za doseganje končne vsebnosti vlage, ki mora znašati od 40 do 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode, doda in vmeša deionizirana voda (potrebna količina). Tla so nato pripravljena za namestitev v preskusne posode. Treba je paziti, ker so nekatera topila lahko strupena za deževnike.

▼M6

Preskusna kemikalija, ki ni topna v vodi in organskih topilih

21. Pripravi se zmes, ki je sestavljena iz 10 g fino mletega industrijskega kremenovega peska in količine preskusne kemikalije, potrebne za doseganje preskusne koncentracije v tleh. Zmes se nato temeljito zmeša s predhodno navlaženimi umetnimi tlemi. Nato se za doseganje končne vsebnosti vlage, ki mora znašati od 40 do 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode, doda in vmeša deionizirana voda (potrebna količina). Tla so nato pripravljena za vstavljanje v preskusne posode.

Nanos preskusne kemikalije na površino tal

22. Tla se tretirajo po dodajanju črvov. Najprej se preskusne posode napolnijo z navlaženim substratom tal, stehtani črvi pa se položijo na površino. Zdravi črvi se običajno takoj zakopljejo v substrat, zato so vsi, ki po 15 minutah ostanejo na površini, opredeljeni kot poškodovani in jih je treba zamenjati. Če se črvi zamenjajo, je treba nove in zamenjane črve stehtati, tako da sta na začetku znani skupna živa teža izpostavljene skupine črvov in skupna teža posode s črvi.

23. Nanese se preskusna kemikalija. Pol ure po namestitvi črvov (ali pa, če so črvi prisotni na površini tal) se preskusne kemikalije ne sme nanašati na tla, da se prepreči neposredna izpostavljenost preskusni kemikaliji prek stika s kožo. Če je preskusna kemikalija pesticid, jo je morda primerno nanesti na površino tal s pršenjem. Preskusno kemikalijo je treba na površino tal nanesti čim bolj enakomerno s primerno laboratorijsko napravo za pršenje, da se posnema pršenje na polju. Pred nanosom je treba odstraniti pokrov preskusne posode in ga nadomestiti z oblogo, ki ščiti stranske stene posode pred pršilom. Oblogo je mogoče izdelati iz preskusne posode z odstranjeno podlogo. Nanos je treba izvesti pri temperaturi v območju variacije 20 ± 2 °C, za vodne raztopine, emulzije ali disperzije pa pri hitrosti nanosa vode med 600 in 800 $\mu l/m^2$. Hitrost je treba preveriti s primerno tehniko kalibracije. Posebne formulacije, kot so zrnca ali obloge semen, je treba nanesti na način, skladen s kmetijsko uporabo.

24. Preskusne posode je treba eno uro pustiti nepokrite, da izhlapijo vsa hlapna topila, povezana z nanosom preskusne kemikalije. Treba je paziti, da v tem času noben črv ne pobegne iz preskusnih posod.

POSTOPEK

Preskusne in kontrolne skupine

25. Priporočljiva je obremenitev z 10 deževniki v 500–600 g suhe mase umetnih tal (tj. 50–60 g tal na črva). Če se uporabljajo velike količine tal, kot v primeru preskušanja pesticidov s posebnimi načini nanosa, npr. oblogami semen, je treba s povečanjem števila črvov vzdrževati obremenitev 50–60 g tal na črva. Za vsako kontrolno posodo in posodo za tretiranje je pripravljenih deset črvov. Črvi se operejo z vodo in obrišejo, nato pa za kratek čas postavijo na vpojni papir, da se odvečna voda odcedi.

26. Za preprečevanje sistematičnih napak pri razporejanju črvov v preskusne posode je treba s tehtanjem 20 črvov, naključno vzorčenih iz populacije, iz katere bodo odvzeti preskusni črvi, ugotoviti homogenost preskusne populacije. Po zagotovitvi homogenosti se nato skupine črvov izberejo, stehtajo in s postopkom naključnega določanja dodelijo preskusnim posodam. Po dodajanju preskusnih črvov je treba vsako posodo stehtati in tako

▼M6

zagotoviti, da obstaja podatek o začetni teži, ki ga je mogoče uporabiti kot osnovo za spremljanje vsebnosti vlage v tleh med celotnim preskusom, kot je opisano v odstavku 30. Nato se preskusne posode pokrijejo, kot je opisano v odstavku 9, in postavijo v preskusno komoro.

27. Za vsako od metod nanosa preskusne kemikalije, opisanih v odstavkih od 18 do 24, se pripravijo ustrezne kontrole. Za pripravo kontrol se upoštevajo ustrezni postopki, z izjemo dodajanja preskusne kemikalije. Zato se na kontrole, kjer je primerno, nanesejo organska topila, kremenov pesek ali drugi vehikli v koncentracijah/količinah, skladnih s koncentracijami/količinami, uporabljenimi pri tretiranih skupinah. Če je za dodajanje preskusni kemikaliji uporabljeno topilo ali drug vehikel, je treba zagotoviti, da vehikel ne vpliva na rezultat, zato je treba pripraviti tudi dodatno kontrolo brez vehikla in preskusne kemikalije ter jo preskusiti.

Preskusni pogoji

28. Preskusna temperatura je 20 ± 2 °C. Preskus se izvaja v nadzorovanih ciklih svetlobe in teme (po možnosti 16 ur svetlobe in 8 ur teme) pri osvetljenosti od 400 do 800 luksov na območju preskusnih posod.

29. Preskusne posode se med preskusom ne prezračujejo, vendar mora zasnova pokrovov preskusne posode omogočati izmenjavo plinov, pri tem pa omejevati izhlapevanje vlage (glej odstavek 9).

30. Vsebnost vode v substratu tal v preskusnih posodah se z rednim ponovnim tehtanjem preskusnih posod (razen njihovih pokrovov) vzdržuje med celotnim preskusom. Izgube se po potrebi nadomeščajo z deionizirano vodo. Vsebnost vode se od vsebnosti na začetku preskusa ne sme razlikovati za več kot 10 %.

Hranjenje

31. Za sprejemljivo velja vsa hrana, katere kakovost je dokazano primerna vsaj za ohranjanje teže črvov med preskusom. Izkušnje so pokazale, da je primerna hrana ovsena kaša ter kravji in konjski gnoj. S preverjanji je treba zagotoviti, da krave ali konji, od katerih je gnoj pridobljen, niso zdravljene ali tretirane s kemikalijami, kot so pospeševalci rasti, nematicidi ali podobni veterinarski proizvodi, ki lahko med preskusom škodljivo vplivajo na črve. Priporočen je samostojno zbrani kravji gnoj, saj so izkušnje pokazale, da lahko na trgu dostopni kravji gnoj, ki se uporablja kot gnojilo za vrt, škodljivo vpliva na črve. Gnoj mora biti pred uporabo posušen na zraku, fino zmlet in pasteriziran.

32. Preden se vsaka sveža šarža hrane uporabi v preskusu, je treba z njo nahraniti nepreskusno kulturo črvov, da se zagotovi njena primerna kakovost. Rast in proizvajanje kokonov ne smeta biti zmanjšana v primerjavi s črvi v substratu, ki ne vsebuje nove šarže hrane (pogoji, kot so opisani v preskusni metodi C.8(4)).

33. Hrana se prvič priskrbi en dan po dodajanju črvov in nanosu preskusne kemikalije na tla. Približno 5 g hrane se raztrese na površino tal vsake posode in navlaži z deionizirano vodo (približno 5–6 ml na posodo). Nato se hrana v 4-tedenskem preskusnem obdobju priskrbi enkrat tedensko. Če

▼M6

hrana ostaja nepoužita, je treba obrok zmanjšati, da se prepreči rast gliv ali plesni. Odrasli osebki se odstranijo iz tal 28. dan preskusa. Nato se v vsako preskusno posodo doda 5 g hrane. Hranjenja med preostalimi 4 tedni preskusa ni več.

Izbira preskusnih koncentracij

34. Predhodno poznavanje strupenosti preskusne kemikalije, npr. iz preskusa akutne strupenosti (4) in/ali iz študij za določanje območja delovanja, bi moralo biti v pomoč pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij. Po potrebi se izvede preskus za določanje območja delovanja z, na primer, petimi preskusnimi koncentracijami, ki znašajo 0,1, 1,0, 10, 100 in 1 000 mg/kg (suhe mase tal). Zadošča ena ponovitev za vsako tretirano skupino in kontrolo. Preskus za določanje območja delovanja traja dva tedna, ob koncu preskusa pa se oceni smrtnost.

Načrt poskusa

35. Ker za preskus ni mogoče predpisati enega samega statističnega povzetka, ta metoda nudi vse potrebno za določitev vrednosti NOEC in EC_x. V predvidljivi prihodnosti bodo regulativni organi verjetno zahtevali vrednost NOEC. V bližnji prihodnosti bo morda zaradi statističnih in ekoloških pomislekov sprejeta bolj razširjena uporaba vrednosti EC_x. Zato se na podlagi priporočil, ki izhajajo iz krožnega preskusa preskusne metode razmnoževanja enhitrejev, predlagajo trije načrti (17).

36. Pri določanju razpona koncentracij se upošteva naslednje:

— Za določitev vrednosti NOEC je treba preskusiti vsaj pet/dvanajst koncentracij v geometrijski vrsti. Priporočene so štiri ponovitve za vsako preskusno koncentracijo in osem kontrol. Med koncentracijami mora biti razmik, katerega faktor ne sme presegati vrednosti 2,0.

— Za določitev vrednosti ECx (npr. EC10, EC50) se priporoča število koncentracij, ki je zadostno, da povzroči vsaj štiri statistično značilne različne povprečne odzive. Priporoča se vsaj dve ponovitvi za vsako preskusno koncentracijo in šest kontrolnih ponovitev. Faktor razmika se lahko spreminja, tj. je v pričakovanem območju učinkov lahko manjši ali enak 1,8, pri višjih in nižjih koncentracijah pa je lahko nad 1,8.

— Kombiniran pristop omogoča določitev vrednosti NOEC in ECx. Treba je uporabiti osem koncentracij za tretiranje v geometrijski vrsti. Priporočene so štiri ponovitve za vsako tretiranje in osem kontrol. Med koncentracijami mora biti razmik, katerega faktor ne sme presegati vrednosti 1,8.

Trajanje preskusa in meritve

37. Na 28. dan se odrasli črvi pregledajo in preštejejo. Zabeležita se tudi morebitno nenormalno vedenje (npr. nezmožnost kopanja v tla, negibno ležanje) in morebitna nenavadna morfologija (npr. odprte rane). Nato se vse odrasle črve odstrani iz preskusnih posod, prešteje in stehta. Iskanje odraslih osebkov je morda lažje, če so tla, ki vsebujejo črve, pred ocenjevanjem prenesena na čist pladenj. Pred tehtanjem se črvi, vzeti iz tal, operejo (z deionizirano vodo), odvečna voda pa se odstrani tako, da se črvi za kratek čas položijo na filtrirni papir. Vse črve, ki jih v tem trenutku ni mogoče najti, je treba zabeležiti kot mrtve, saj je treba predpostavljati, da so ti črvi pred ocenjevanjem umrli in se razgradili.

▼M6

38. Če so bila tla odstranjena iz posod, se nato vrnejo (brez odraslih črvov, vendar z vsemi proizvedenimi kokoni). Nato se tla štiri dodatne tedne inkubirajo pri enakih preskusnih pogojih, razen hranjenja, ki se opravi le enkrat na začetku te faze preskusa (glej odstavek 33).

39. Ob koncu drugega 4-tedenskega obdobja se s postopki, opisanimi v Dodatku 5, določi število mladičev, izleženih iz kokonov v preskusnih tleh, in število kokonov. V celotnem obdobju preskusa je treba beležiti tudi vse znake poškodb pri črvih ali škodljivih učinkov nanje.

Mejni preskus

40. Če pri največji koncentraciji v preskusu za določanje območja delovanja (tj. 1 000 mg/kg) ni opaženih učinkov, bo preskus razmnoževanja izveden kot mejni preskus s koncentracijo 1 000 mg/kg. Mejni preskus bo ponudil možnost dokazovanja, da je vrednost NOEC za razmnoževanje večja od mejne koncentracije, pri čemer bo število črvov, uporabljenih v preskusu, kar najmanjše. Za tretirana tla in kontrolo je treba uporabiti osem ponovitev.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

41. Čeprav je v Dodatku 6 podan pregled, v tej preskusni metodi ni podana nobena dokončna statistična smernica za analizo rezultatov preskusa.

42. Ena od končnih točk je smrtnost. Vendar je treba zabeležiti tudi spremembe vedenja odraslih osebkov (npr. nezmožnost kopanja v tla, negibno ležanje ob stekleni steni preskusne posode) in morfologije (npr. odprte rane) ter morebitno prisotnost mladičev. Za določanje vrednosti LC_{50} se običajno uporabi analiza probit (18) ali regresija logit. Vendar pa je mogoče v primerih, pri katerih ta analitska metoda ni primerna (npr. če so na voljo manj kot tri koncentracije z delnimi usmrtitvami), uporabiti alternativne metode. Te metode lahko vključujejo drseča povprečja (19), prilagojeno metodo Spearman-Karber (20) ali enostavno interpolacijo (npr. geometrijsko sredino vrednosti LC_0 in LC_{100}, izračunano s kvadratnim korenom zmnožka vrednosti LC_0 in LC_{100}).

43. Druga končna točka je plodnost (tj. število ustvarjenih mladičev). Vendar je treba v končno poročilo, tako kot pri preskusu za določanje območja delovanja, zabeležiti vse druge škodljive znake. Za statistično analizo morata biti izračunani aritmetična sredina $\bar{x}$ in standardni odklon za razmnoževanje pri posamezni tretirani skupini in kontroli.

44. Če je izvedena analiza variance, je mogoče standardni odklon, s, in stopinje prostosti, df, nadomestiti z oceno skupne variance, pridobljene z analizo variance (ANOVA) oziroma z njenimi stopinjami, če varianca ni odvisna od koncentracije. V tem primeru uporabite enosmerne analize variance kontrol in tretiranih skupin. Te vrednosti se navadno izračunajo s komercialno programsko opremo za statistiko, pri čemer so rezultati glede na posodo uporabljeni kot ponovitve. Če se zdi, da je združevanje podatkov za negativne kontrole in kontrole s topilom bolj smiselno od preskušanja glede na enega od njih, jih je treba preskusiti, da se preveri, da med njimi ni značilnih razlik (za ustrezne preskuse glej odstavek 47 in Dodatek 6).

45. Nadaljnje statistično preskušanje in sklepanje je odvisno od tega, ali so vrednosti ponovitev normalno porazdeljene in homogene glede na svojo varianco.

▼M6

Ocena vrednosti NOEC

46. Prednost mora imeti uporaba učinkovitih preskusov. Uporabiti je treba informacije npr. iz predhodnih izkušenj s krožnim preskušanjem ali druge podatke iz preteklih študij o tem, ali so podatki približno normalno porazdeljeni. Homogenost variance (homoskedastičnost) je bolj kritična. Izkušnje kažejo, da varianca pogosto narašča z naraščajočo srednjo vrednostjo. V teh primerih transformacija podatkov lahko privede do homoskedastičnosti. Vendar mora taka transformacija temeljiti na izkušnjah s podatki iz preteklih študij in ne na podatkih, ki se proučujejo. Pri homogenih podatkih je treba izvesti več t-preskusov, kot je Williamsov preskus (α = 0,05, enostranski) (21)(22) ali, v nekaterih primerih, Dunnettov preskus (23)(24). Velja pripomniti, da je treba v primeru neenake ponovitve popraviti vrednosti t iz preglednice tako, kot sta predlagala Dunnett in Williams. Včasih se odzivi zaradi velike variacije ne povečajo/zmanjšajo pravilno. V tem primeru velikega odklona od monotonosti je bolj primeren Dunnettov preskus. Če obstajajo odkloni od homoskedastičnosti, je morda smiselno natančneje proučiti možne učinke na variance, da se ugotovi, ali je mogoče uporabiti t-preskuse brez prevelike izgube učinkovitosti (25). Druga možnost je uporaba večkratnega U-preskusa, npr. Bonferronijevega U-preskusa po Holmu (26), ali – če ti podatki kažejo heteroskedastičnost, sicer pa so skladni z osnovnim monotonim razmerjem odmerek-odziv – drugega neparametričnega preskusa (npr. preskusa po Jonckheere-Terpstraju (27)(28) ali Shirleyjevega preskusa (29)(30)); uporaba takšnega preskusa ima v splošnem prednost pred t-preskusi za neenake variance. (Glej tudi shemo v Dodatku 6.)

47. Če je izveden mejni preskus in so izpolnjeni predpogoji za postopke parametričnih preskusov (normalnost, homogenost), je mogoče uporabiti parni Studentov t-preskus ali, namesto tega, postopek Mann-Whitneyjevega U-preskusa (31).

Ocena vrednosti EC_x

48. Za izračun katere koli vrednosti EC_x se po pridobitvi ustrezne funkcije odmerek-odziv za regresijsko analizo (linearno ali nelinearno) uporabijo srednje vrednosti glede na tretirano skupino. Za rast črvov v obliki zveznega odziva je mogoče vrednosti EC_x oceniti z ustrezno regresijsko analizo (32). Med primernimi funkcijami za kvantne podatke (smrtnost/preživetje) in število ustvarjenih potomcev so normalna sigmoidna funkcija in logistične ali Weibullove funkcije, ki vsebujejo od dva do štiri parametre, pri čemer nekatere lahko modelirajo tudi odzive v obliki hormeze. Če je bila funkcija odmerek-odziv prilagojena z linearno regresijsko analizo, je treba v regresijski analizi pred ocenjevanjem vrednosti EC_x najti značilni r^2 (determinacijski koeficient) in/ali naklon, tako da se v enačbo, podano z regresijsko analizo, vstavi vrednost, ki ustreza x % srednje vrednosti kontrole. V skladu s Fiellerjem (navedeno v Finney (18)) ali z drugimi ustreznimi sodobnimi metodami se izračunajo 95-odstotne meje zaupanja.

49. Namesto tega se odziv lahko modelira kot odstotek ali razmerje parametra modela, ki se razlaga kot srednja vrednost odziva kontrole. V teh primerih je mogoče običajno (logistično, Weibullovo) sigmoidno krivuljo pogosto enostavno prilagoditi rezultatom s postopkom regresije probit (18). V teh primerih je treba utežno funkcijo prilagoditi za odzive metrik, kot je podano v Christensen (33). Če pa je ugotovljena hormeza, mora analizo probit nadomestiti logistična ali Weibullova funkcija s štirimi parametri, prilagojena s postopkom nelinearne regresije (34). Če podatkom ni mogoče prilagoditi primerne funkcije odmerek-odziv, je mogoče za oceno vrednosti EC_x in njenih meja zaupanja uporabiti alternativne metode, kot so drseča povprečja po Thompsonu (19) in postopek prilagojene metode Spearman-Karber (20).

POROČILO O PRESKUSU

50. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

▼M6

Preskusna kemikalija:

— dokončen opis preskusne kemikalije, serija, skupina in številka CAS, čistost,

— lastnosti preskusne kemikalije (npr. vrednost log Kow, topnost v vodi, parni tlak, Henryjeva konstanta (H) ter informacije o usodi in vedenju).

Preskusni organizmi:

— uporabljene preskusne živali: vrsta, znanstveno ime, vir organizmov in pogoji gojenja,

— razpon starosti in velikosti (mase) preskusnih organizmov.

Preskusni pogoji

— podrobnosti o pripravi preskusnih tal,

— največja zmogljivost zadrževanja vode v tleh,

— opis tehnike, uporabljene za nanos preskusne kemikalije na tla,

— podrobnosti o pomožnih kemikalijah, uporabljenih za dodajanje preskusne kemikalije,

— podrobnosti o kalibraciji za opremo za pršenje, če je to smiselno,

— opis načrta in postopkov poskusa,

— velikost preskusnih posod in količina preskusnih tal,

— preskusni pogoji: obsevanost, trajanje ciklov svetlobe in teme, temperatura,

— opis režima hranjenja, vrsta in količina hrane, uporabljene v preskusu, datumi hranjenja,

— vrednost pH in vsebnost vode v tleh na začetku in koncu preskusa.

Rezultati preskusa:

— smrtnost pri odraslih osebkih (%) v vsaki preskusni posodi ob izteku prvih 4 tednov preskusa,

— skupna masa odraslih osebkov na začetku preskusa v vsaki preskusni posodi,

— spremembe telesne teže živih odraslih osebkov (% začetne teže) v vsaki preskusni posodi po prvih štirih tednih preskusa,

— število mladičev, ustvarjenih v vsaki preskusni posodi ob koncu preskusa,

— opis očitnih ali patoloških simptomov ali jasnih sprememb vedenja,

— rezultati, pridobljeni z referenčno preskusno kemikalijo,

— vrednosti LC_{50}, NOEC in/ali EC_x (npr. EC_{50}, EC_{10}) za razmnoževanje, če je mogoče nekatere od njih uporabiti znotraj intervalov zaupanja, krivulja prilagojenega modela, uporabljena za njegov izračun, ter vse informacije in opažanja, ki pripomorejo k razlagi rezultatov,

— grafični prikaz razmerja med odmerkom in odzivom,

— rezultati, ki se nanašajo na vsako preskusno posodo.

Odstopanja od postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, in morebitni nenavadni dogodki med preskusom.

LITERATURA

(1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4, 6–8.

(2) Oien, N., in Stenerson, J. (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277–282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. V: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, str. 50–82.

(4) Poglavje C.8 te priloge, Strupenost za deževnike (preskus).

(5) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, št. 11268-2. ISO, Ženeva.

(6) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, št. 11268-1. ISO, Ženeva.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S. C., Bembridge, J. D., Holmstrup, M. in L. Posthuma (ur.). SETAC Press, 456 str.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, april 1996.

(9) Bouché, M. B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C. A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P. W., Becker, H., Edwards, P. J., in Heimbach, F. (ur.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C. A., in Bohlen, J. P. (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3. izdaja. Chapman and Hall, London.

(13) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1994). Kakovost tal – Določevanje pH, št. 10390. ISO, Ženeva.

(14) Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F., in Achazi, R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. V: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W. in Eisentraeger A. (ur.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(15) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1992). Kakovost tal – Določevanje karakteristik zadrževanja vode – Laboratorijske metode, št. 11274. ISO, Ženeva.

(16) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1993). Kakovost tal – Ugotavljanje suhe snovi in vsebnosti vode na osnovi mase – Gravimetrijska metoda, št. 11465. ISO, Ženeva.

(17) Römbke, J., in Moser, Th. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 str.

▼**M6**

(18) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3. izdaja), str. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. -Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M. A., Russo, R. C., in Thurston, R.V. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355–361.

(26) Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133– 145.

(28) Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327–333.

(29) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144– 151.

(30) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183– 186.

(31) Sokal, R. R., in Rohlf, F. J. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2. izdaja. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce, R. D., in Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485– 1494.

(33) Christensen, E. R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213–221.

(34) Van Ewijk, P. H., in Hoekstra, J. A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Pri tej preskusni metodi se uporabljajo naslednje opredelitve:

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

EC_x (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki na preskusnih organizmih v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo učinkuje x-odstotno. Vrednost EC_{50} je, na primer, koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da na končno točko preskusa učinkuje 50-odstotno glede na izpostavljeno populacijo v določenem obdobju izpostavljenosti. V tem preskusu so učinkovite koncentracije izražene kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal ali kot masa preskusne kemikalije na enoto površine tal.

LC_0 (koncentracija brez smrtnega učinka) je koncentracija preskusne kemikalije, ki v določenem časovnem obdobju ne ubije nobenega od izpostavljenih preskusnih organizmov. V tem preskusu je LC_0 izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal.

LC_{50} (srednja smrtna koncentracija) je koncentracija preskusne kemikalije, ki v določenem časovnem obdobju ubije 50 % izpostavljenih preskusnih organizmov. V tem preskusu je LC_{50} izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal ali kot masa preskusne kemikalije na enoto površine tal.

LC_{100} (popolnoma smrtna koncentracija) je koncentracija preskusne kemikalije, ki v določenem časovnem obdobju ubije 100 % izpostavljenih preskusnih organizmov. V tem preskusu je LC_{100} izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal.

LOEC (najnižja koncentracija z opaznim učinkom) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki ima statistično značilen učinek ($p < 0,05$). V tem preskusu je vrednost LOEC izražena kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal ali kot masa preskusne kemikalije na enoto površine tal. Vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC morajo običajno kazati učinek, ki je statistično različen od kontrole. Vsa odstopanja od zgoraj navedenega morajo biti utemeljena v poročilu o preskusu.

NOEC (koncentracija brez opaznega učinka) je najvišja koncentracija preskusne kemikalije tik pod vrednostjo LOEC, pri kateri ni opaznega učinka. V tem preskusu koncentracija, ki ustreza vrednosti NOEC, v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$).

Hitrost razmnoževanja: srednja vrednost števila mladih črvov, ki jih ustvari določeno število odraslih osebkov v preskusnem obdobju.

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M6

Dodatek 2

Določanje največje zmogljivosti zadrževanja vode

Kot primerna se je izkazala naslednja metoda za določanje največje zmogljivosti zadrževanja vode v tleh. Opisana je v Prilogi C standarda ISO DIS 11268-2 (1).

S primerno napravo za vzorčenje (svedrastim vzorčevalnikom itd.) zberite določeno količino (npr. 5 g) substrata preskusnih tal. Pokrijte dno vzorčevalnika s koščkom filtrirnega papirja, ga napolnite z vodo in ga nato postavite na stojalo v vodno kopel. Vzorčevalnik je treba postopoma potapljati, dokler nivo vode ni nad zgornjim delom tal. Nato ga je treba pustiti v vodi približno tri ure. Ker ni mogoče zadržati vse vode, ki jo absorbirajo talne kapilare, mora biti omogočeno, da se vzorec tal dve uri suši, tako da se vzorčevalnik postavi na ležišče iz zelo mokrega, fino mletega kremenovega peska, ki je nameščen v pokriti posodi (da se ne posuši). Nato je treba vzorec stehtati in pri 105 °C posušiti na konstantno maso. Zmogljivost zadrževanja vode (WHC) je nato mogoče izračunati po naslednjem postopku:

$$\text{WHC (v \% suhe mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

pri čemer je:

S = z vodo nasičeni substrat + masa vzorčevalnika + masa filtrirnega papirja,

T = tara (masa vzorčevalnika + masa filtrirnega papirja),

D = suha masa substrata.

VIR:

(1) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, št. 11268-2. ISO, Ženeva.

▼**M6**

Dodatek 3

Določanje vrednosti pH tal

Naslednja metoda za določanje vrednosti pH tal temelji na opisu v ISO 10390: Kakovost tal – Določevanje pH (1).

Določena količina tal se pri sobni temperaturi suši vsaj 12 ur. Nato se izdela suspenzija tal (ki vsebuje vsaj 5 gramov tal) v petkratni količini volumna tal z 1 M analitsko čistega kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M raztopine analitsko čistega kalcijevega klorida ($CaCl_2$). Suspenzija se nato pet minut temeljito stresa ter se nato vsaj 2 uri in največ 24 ur pusti, da se usede. Vrednost pH tekoče faze se nato meri z merilnikom vrednosti pH, ki je pred vsako meritvijo umerjen z ustreznimi vrstami pufrskih raztopin (npr. pH 4,0 in 7,0).

VIR:

(1) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1994). Kakovost tal – Določevanje pH, št. 10390. ISO, Ženeva.

▼M6

Dodatek 4

Gojenje deževnikov vrste *Eisenia fetida/Eisenia andrei*

Gojenje je po možnosti treba izvajati v klimatizirani komori pri temperaturi 20 °C ± 2 °C. Pri tej temperaturi in ob zadostni količini hrane črvi postanejo zreli po preteku približno 2 do 3 mesecev.

Obe vrsti je mogoče gojiti v zelo različnih živalskih odpadkih. Priporočeno gojišče je mešanica konjskega ali kravjega gnoja in šote v razmerju 50: 50. S preverjanji je treba zagotoviti, da krave ali konji, od katerih je gnoj pridobljen, niso zdravljene ali tretirane s kemikalijami, kot so pospeševalci rasti, nematicidi ali podobni veterinarski proizvodi, ki lahko med preskusom škodljivo vplivajo na črve. Priporočen je samostojno zbrani kravji gnoj iz „ekološkega“ vira, saj so izkušnje pokazale, da lahko na trgu dostopni gnoj, ki se uporablja kot gnojilo za vrt, škodljivo vpliva na črve. Gojišče mora imeti vrednost pH približno 6–7 (uravnavano s kalcijevim karbonatom), majhno ionsko prevodnost (manj kot 6 mS/cm ali manj kot 0,5-odstotno koncentracijo soli) in ne sme biti pretirano kontaminirano z amonijakom ali živalskim urinom. Substrat mora biti vlažen, vendar ne preveč moker. Primerne so škatle za gojenje s prostornino od 10 do 50 litrov.

Za črve standardne starosti in velikosti (mase) je gojenje najbolje začeti s kokoni. Ko je kultura vzpostavljena, se vzdržuje tako, da se odrasli črvi za obdobje 14–28 dni namestijo v škatlo za gojenje s svežim substratom, kar omogoča produkcijo dodatnih kokonov. Nato se odrasli osebki odstranijo, mladiči, ustvarjeni iz kokonov, pa se uporabijo kot osnova za novo kulturo. Črvi se neprekinjeno hranijo z živalskimi odpadki in občasno prenesejo v svež substrat. Izkušnje so pokazale, da je primerna hrana na zraku posušen, fino zmlet kravji ali konjski gnoj ali ovsena kaša. Treba je zagotoviti, da krave ali konji, od katerih je pridobljen gnoj, niso zdravljene s kemikalijami, kot so pospeševalci rasti, ki lahko med dolgotrajnim gojenjem škodljivo vplivajo na črve. Črvi, ki so se izlegli iz kokonov, se uporabijo za preskušanje, ko dosežejo starost med 2 in 12 meseci in veljajo za odrasle.

Velja, da so črvi zdravi, če se premikajo skozi substrat, če ne skušajo zapustiti substrata in če se neprestano razmnožujejo. Izčrpanost substrata se kaže tako, da se črvi premikajo zelo počasi in da je njihov zadnji del rumen. V tem primeru je priporočena dobava novega substrata in/ali zmanjšanje gostote populacije živali.

▼M6

Dodatek 5

Tehnike štetja mladih črvov, izleženih iz kokonov

Ročno razvrščanje črvov iz substrata tal je časovno zelo potratno. Zato se priporočata dve alternativni metodi:

(a) Preskusne posode se postavijo v vodno kopel, pri čemer na začetku temperatura znaša 40 °C, nato pa narašča do 60 °C. Po približno 20 minutah bi se morali mladi črvi pojaviti na površini tal, od koder jih je enostavno odstraniti in prešteti.

(b) Preskusna tla se lahko izperejo prek sita z metodo, ki so jo razvili van Gestel in drugi (1) pod pogojem, da so bili šota in gnoj ali ovsena kaša, ki so bili dodani tlom, zmleti v fin prah. Dve siti z velikostjo mreže 0,5 mm (in premerom 30 cm) se postavita eno na drugega. Vsebina preskusne posode se opere skozi siti z močnim curkom vodovodne vode, pri čemer mladi črvi in kokoni večinoma ostanejo na zgornjem situ. Pomembno je opozoriti, da mora biti med tem postopkom celotna površina zgornjega sita ves čas mokra, tako da mladi črvi lebdijo na prevleki iz vode, kar preprečuje, da bi spolzeli skozi pore sita. Rezultati so najboljši, če je uporabljena ročka za tuš.

Ko je skozi sito opran ves substrat tal, se mladiče in kokone lahko spere z zgornjega sita v posodo. Nato se vsebina posode pusti stati, kar omogoča, da prazni kokoni lebdijo na površini vode, polni kokoni in mladi črvi pa potonejo na dno. Stoječo vodo se nato lahko odlije, mlade črve in kokone pa prenese v petrijevko, v kateri je malo vode. Črvi se za štetje lahko odstranijo z iglo ali pinceto.

Izkušnje so pokazale, da je metoda (a) primernejša za ekstrakcijo mladih črvov, ki jih je mogoče izprati celo skozi 0,5-milimetrsko sito.

Vedno je treba določiti učinkovitost metode, uporabljene za odstranjevanje črvov (in kokonov, če je to primerno) iz substrata tal. Če se črvi zbirajo z ročnim razvrščanjem, je postopek na vseh vzorcih priporočljivo izvesti dvakrat.

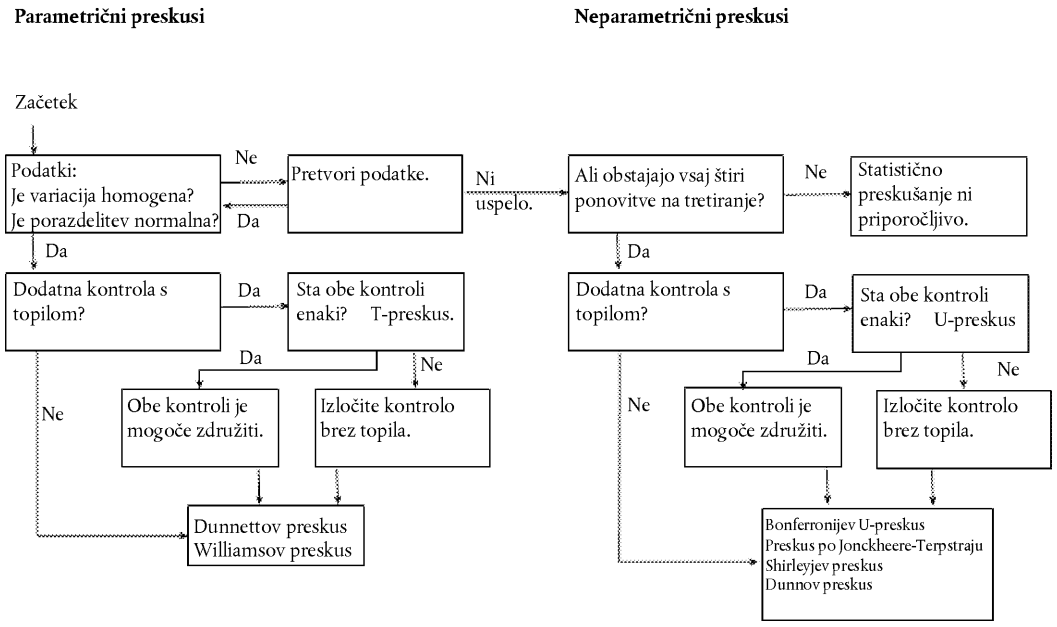
VIR:

(1) Van Gestel, C. A. M., van Dis, W. A., van Breemen, E. M., Sparenburg, P. M. (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367–371.

▼M6

Dodatek 6

Pregled statistične ocene podatkov (določitev vrednosti NOEC)



▼M6

C.34 **DOLOČANJE ZAVIRANJA DELOVANJA ANAEROBNIH BAKTERIJ – ZMANJŠANJE NASTAJANJA PLINA IZ ANAEROBNO GNIJOČEGA BLATA (IZ ODPLAK)**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 224 (2007). Kemikalije, izpuščene v vodno okolje, prehajajo prek aerobnih in anaerobnih območij, kjer lahko razpadejo in/ali zavirajo delovanje bakterij; v nekaterih primerih lahko nemoteno ostajajo v anaerobnih območjih več desetletij in še dlje. Pri čiščenju odpadne vode je prva stopnja, primarni usedalnik, aerobna v tekočini supernatanta in anaerobna v blatu subnatanta. Temu sledi sekundarna stopnja z aerobnim območjem v bazenu za prezračevanje aktivnega blata in anaerobnim območjem v blatu subnatanta v bazenu sekundarnega usedalnika. Blato iz obeh stopenj je po navadi izpostavljeno anaerobnemu čiščenju, pri čemer nastajata metan in ogljikov dioksid, ki se običajno uporabljata za proizvodnjo električne energije. V širšem okolju je verjetno, da bodo kemikalije, ki dosežejo usedline v zalivih, rečnih ustjih in morju, ostale v teh anaerobnih območjih neomejeno dolgo, če niso biorazgradljive. Nekatere kemikalije bodo po možnosti dosegle ta območja v večjih deležih zaradi svojih fizikalnih lastnosti, kot so slaba topnost v vodi, visoka stopnja adsorpcije na suspendirane trdne snovi in nezmožnost aerobne biorazgradljivosti.

2. Čeprav je zaželeno, da so kemikalije, izpuščene v okolje, biorazgradljive v aerobnih in anaerobnih pogojih, je ključnega pomena, da takšne kemikalije ne zavirajo dejavnosti mikroorganizmov v nobenem od obeh območij. V Združenem kraljestvu je nekaj primerov popolnega zavrtja nastajanja metana, ki ga je povzročil, na primer, pentaklorofenol v industrijskih izpustih, kar je vodilo k dragemu prevozu zavrtega blata iz gnilišč na „varna mesta“ in uvozu zdravo gnijočega blata iz sosednjih naprav. Obstaja pa veliko primerov manj resne prekinitve gnitja zaradi več drugih kemikalij, vključno z alifatskimi halogeniranimi ogljikovodiki (iz kemičnih čistilnic) in detergenti, kar je znatno poslabšalo učinkovitost gnilišča.

3. Samo ena preskusna metoda, C.11 (1), se ukvarja z zaviranjem delovanja bakterij (dihanja aktivnega blata); ocenjuje učinek preskusnih kemikalij na hitrost privzema kisika v prisotnosti substrata. Metoda se pogosto uporablja za zgodnje opozarjanje o možnih škodljivih učinkih kemikalij na aerobno čiščenje odpadnih vod, pa tudi kot kazalnik neinhibitornih koncentracij preskusnih kemikalij, ki bodo uporabljene v različnih preskusih biorazgradljivosti. Preskusna metoda C.43 (2) omogoča omejeno možnost za določanje strupenosti preskusne kemikalije za plin, ki ga proizvaja anaerobno blato, razredčeno na eno desetino svoje običajne koncentracije trdnih snovi, kar omogoča zahtevano natančnost pri oceni odstotka biorazgradljivosti. Ker je razredčeno blato lahko občutljivejše na inhibitorne kemikalije, se je skupina ISO odločila, da pripravi metodo z uporabo nerazredčenega blata. Pregledana so bila vsaj tri besedila (z Danske, iz Nemčije in iz Združenega kraljestva) in na koncu sta bila pripravljena dva standarda ISO; prvi, ISO 13 641-1 (3), z uporabo nerazredčenega blata, drugi, ISO 13 641-2 (4), pa z uporabo na eno stotino razredčenega blata, kar predstavlja blata in usedline z majhnimi populacijami bakterij. Pri obeh metodah je bil opravljen krožni preskus (5); 1. del je bil potrjen kot sprejemljiv standard, glede 2. dela pa je prišlo do nesoglasja. Predstavniki Združenega kraljestva so menili, da metoda zahteva nadaljnje proučevanje, ker je znaten delež udeležencev poročal o zelo majhnem ali ničnem nastajanju plina, deloma zato, ker je bil prostor za plin v odstotkih prevelik (pri 75 %) za optimalno občutljivost.

4. Zgodnejše delo v Združenem kraljestvu (6)(7) je opisovalo manometrično metodo z nerazredčenim gnijočim blatom in nepredelanim blatom iz odplak kot substratom v 500-mililitrskih bučkah; naprava je bila nerodna, smrad nepredelanega blata pa neprijeten. Kasneje so Wilson in drugi uspešno

▼M6

uporabili kompaktnejšo in priročnejšo napravo Sheltona in Tiedjeja (8), kot sta jo razvila Battersby in Wilson (9)(10). Kawahara in drugi (11) so v laboratoriju uspešno pripravili več standardnih blat za uporabo v preskusih za anaerobno biorazgradljivost in zaviranje pri več kemikalijah. Poleg tega je bilo pri izvedbi preskusa nepredelano blato kot substrat zamenjano z anaerobnim blatom, razredčenim na eno stotino, ali z blati, usedlinami itd. s šibkim delovanjem bakterij.

5. S to metodo je mogoče pridobiti informacije, ki so uporabne pri predvidevanju verjetnega učinka preskusne kemikalije na nastajanje plina v anaerobnih gniliščih. Vendar lahko le daljši preskusi, ki natančneje posnemajo delujoča gnilišča, pokažejo, ali lahko pride do prilagoditve mikroorganizmov preskusni kemikaliji in ali se lahko kemikalije, za katere je verjetno, da se bodo absorbirale in adsorbirale na blato, v daljšem časovnem obdobju, kot ga omogoča ta preskus, nakopičijo do koncentracije, ki je strupena.

NAČELO PRESKUSA

6. Alikvoti zmesi anaerobno gnijočega blata (od 20 g/l do 40 g/l vseh snovi v trdnem stanju) in razgradljiva raztopina substrata se inkubirajo do 3 dni v zatesnjenih posodah posamezno in hkrati z razponom koncentracij preskusne kemikalije. Količina nastalega plina (metana in ogljikovega dioksida) se meri prek povečanja tlaka (Pa) v steklenicah. Odstotek zaviranja nastajanja plina, ki so ga povzročile različne koncentracije preskusne kemikalije, se izračuna iz količin, pridobljenih v zadevnih preskusnih in kontrolnih steklenicah. Vrednost EC_{50} in druge učinkovite koncentracije se izračunajo iz krivulj odstotka zaviranja v primerjavi s koncentracijo preskusnih kemikalij ali, pogosteje, njenega logaritma.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

7. Preskusne kemikalije je običajno treba uporabljati v najčistejši obliki, ki je lahko dostopna, saj so lahko nečistote v nekaterih kemikalijah, npr. klorofenolih, precej bolj strupene od preskusne kemikalije same. Vendar je treba upoštevati potrebe po preskušanju kemikalij v obliki, v kateri so proizvedene/dane na trg. Uporaba formuliranih produktov običajno ni priporočljiva, pri slabo topnih preskusnih kemikalijah pa je uporaba formuliranega materiala lahko primerna. Lastnosti preskusne kemikalije, ki morajo biti na voljo, vključujejo topnost v vodi in nekaterih organskih topilih, parni tlak, adsorpcijski koeficient, hidrolizo in biorazgradljivost v anaerobnih pogojih.

UPORABA METODE

8. Preskus se uporablja pri kemikalijah, ki so topne ali netopne v vodi, vključno s hlapnimi kemikalijami. Vendar pa je posebna previdnost potrebna pri materialih z nizko topnostjo v vodi (glej vir (12)) in visoko hlapnostjo. Uporabljajo se lahko tudi inokulumi z drugih anaerobnih mest, npr. blat, nasičenih tal, usedlin. Anaerobne bakterijske sisteme, ki so bili prej izpostavljeni strupenim kemikalijam, je mogoče prilagoditi tako, da ohranijo svojo dejavnost v prisotnosti ksenobiotičnih kemikalij. Inokulumi iz prilagojenih bakterijskih sistemov lahko v primerjavi z inokulumi, pridobljenimi iz neprilagojenih sistemov, kažejo večjo toleranco na preskusne kemikalije.

REFERENČNE KEMIKALIJE

9. Za preverjanje postopka se referenčna kemikalija preskusi s postavitvijo ustreznih posod vzporedno kot del običajnih potekov preskusa; izkazalo se je, da je 3,5-diklorofenol dosleden zaviralec anaerobnega nastajanja plinov, pa tudi porabe kisika aktivnega blata in drugih biokemičnih reakcij. Dve drugi kemikaliji, metilen bis-tiocianat in pentaklorofenol, sta se izkazali kot močnejša zaviralca nastajanja metana od 3,5-diklorofenola, vendar pa rezultati pri njiju niso potrjeni. Pentaklorofenol se ne priporoča, ker ni lahko dostopen v čisti obliki.

▼M6

OBNOVLJIVOST REZULTATOV

10. V mednarodnem krožnem preskusu (5) je bila obnovljivost med 10 sodelujočimi laboratoriji primerna le pri vrednostih EC_{50} za 3,5-diklorofenol in 2-bromo-etan sulfonsko kislino. (Razpon prve je bil od 32–502 mg/l, slednje pa 220–2 190 mg/l.)

Število laboratorijev	V mg/l			V mg/g blata		
	srednja vrednost	st. odklon	KV (%)	srednja vrednost	st. odklon	KV (%)
	3,5-diklorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromo-etan sulfonska kislina					
10	1 058	896	85	34	26	76

Podatki o EC_{50} iz krožnega preskusa – nerazredčeno blato

11. Visoki koeficienti variacije med laboratoriji v veliki meri kažejo na razlike v občutljivosti mikroorganizmov v blatu zaradi predhodne izpostavljenosti ali zaradi predhodne neizpostavljenosti preskusni kemikaliji ali drugim kemično sorodnim kemikalijam. Natančnost, s katero je bila določena vrednost EC_{50} na osnovi koncentracije blata, je bila komaj kaj boljša od „volumetrične“ vrednosti (mg/l). Trije laboratoriji, ki so poročali o natančnosti svojih vrednosti EC_{50} za 3,5-diklorofenol, so kazali koeficiente variacije (22, 9 oziroma 18 % za EC_{50} mg/g), ki so bili precej nižji od koeficientov variacije srednjih vrednosti vseh desetih laboratorijev. Posamezne srednje vrednosti za omenjene tri laboratorije so bile 3,1, 3,2 oziroma 2,8 mg/g. Nižji, sprejemljivi koeficienti variacije znotraj laboratorijev v primerjavi s precej višjimi koeficienti med laboratoriji, namreč 9–22 % v prim. z 92 %, kažejo, da obstajajo značilne razlike med lastnostmi posameznih blat.

OPIS METODE

Naprava

12. Zahtevani so običajna laboratorijska oprema in naslednje:

a) inkubator – biti mora zaščiten pred iskrami in nastavljen na 35 °C ± 2 °C;

b) na tlak odporne preskusne posode ustrezne nazivne velikosti ([1]); vsaka mora biti opremljena z zaporko, prevlečeno s plinotesno prevleko, ki lahko prenese tlak približno 2 bar ali 2×10^5 Pa (za prevleko uporabite npr. PTFE = politetrafluoreten). Priporočljive so steklene serumske steklenice nazivne prostornine 125 ml in z dejansko prostornino približno 160 ml, zatesnjene s serumskimi zaporkami ([2]) in z aluminijastimi zapornimi obročki, vendar pa je mogoče uspešno uporabljati steklenice s skupno prostornino med 0,1 litra in 1 litrom;

([1]) Priporočena velikost je od 0,1 do 1 litra.

([2]) Priporočljiva je uporaba plinotesnih silikonskih zapork. Priporočljivo je tudi preskušanje plinotesnosti pokrovčkov, še posebej zapork iz butilnega kavčuka, ker številne na trgu dostopne zaporke niso dovolj plinotesne za metan in ker nekatere zaporke ne tesnijo več, ko se v pogojih preskusa prebodejo z iglo.
- Za hlapne kemikalije so priporočljive in se morajo uporabljati plinotesne prevlečene zaporke (nekatere na trgu dostopne zaporke so precej tanke – njihova debelina znaša manj kot 0,5 cm – in po prebadanju z injekcijsko iglo niso več plinotesne).
- Če preskusne snovi niso hlapne, se priporočajo zaporke iz butilnega kavčuka (debeline približno 1 cm; te po prebadanju običajno ostanejo plinotesne).
- Pred preskusom je priporočljivo skrbno preveriti, ali so zaporke po prebadanju še vedno plinotesne.

▼M6

c) natančen merilnik tlaka ([1]) s priključkom za iglo;

d) skupno nastajanje plina (metana in ogljikovega dioksida), merjeno z merilnikom tlaka, prilagojenim tako, da omogoča merjenje in odvajanje nastalega plina. Primer ustreznega instrumenta je ročni natančni merilnik tlaka, povezan z injekcijsko iglo; trojni plinotesni petelinček olajša sprostitev odvečnega tlaka (Dodatek 1). Notranjo prostornino cevi in ventila tipala diferenčnega tlaka je treba vzdrževati na čim manjši ravni, tako da so napake, ki nastanejo zaradi zanemarjanja prostornine opreme, nepomembne;

e) izolirane posode za prevoz gnijočega blata;

f) trojni petelinčki;

g) sito s kvadratnimi 1-milimetrskimi odprtinami;

h) rezervoar za gnijoče blato, steklena steklenica ali steklenica iz polietilena visoke gostote s prostornino približno 5 litrov, opremljena z mešalom in opremo za prehod toka dušikovega plina (glej odstavek 13) skozi prostor nad fazno mejo plin-kapljevina;

i) membranski filtri (0,2 μm) za sterilizacijo substrata;

j) mikrobrizge za plinotesno povezavo tipala diferenčnega tlaka (glej odstavek 12(c)) s prostorom nad fazno mejo plin-kapljevina v steklenicah (glej odstavek 12(b)); tudi za dodajanje netopnih tekočih preskusnih materialov v steklenice;

k) komora z rokavicami: neobvezna, a priporočljiva, s rahlo pozitivnim tlakom dušika.

Reagenti

13. Ves čas se uporabljajo analitsko čisti reagenti. Ves čas je treba uporabljati dušikov plin visoke čistosti z vsebnostjo kisika, manjšo od 5 μl/l.

Voda

14. Če je v kateri koli fazi potrebna razredčitev, uporabite predhodno razplinjeno deionizirano vodo. Analitske kontrole te vode niso potrebne, poskrbite pa za redno vzdrževanje naprave za deionizacijo. Deionizirano vodo uporabite tudi za pripravo založnih raztopin. Pred dodajanjem anaerobnega inokuluma kateri koli raztopini ali razredčitvi preskusnega materiala se prepričajte, da raztopina ali razredčitev ne vsebujeta kisika. To storite z enournim razpihavanjem dušikovega plina skozi vodo za redčenje (ali skozi razredčitve) pred dodajanjem inokuluma, druga možnost pa je, da v ozračju brez kisika vodo za redčenje ogrejete do vrelišča in jo ohladite na sobno temperaturo.

Pregnito blato

15. Zberite aktivno gnijoče blato iz gnilišča v čistilni napravi za odpadne vode ali, namesto tega, iz laboratorijskega gnilišča, kjer se čisti blato večinoma iz gospodinjskih odplak. Praktične informacije o blatu iz laboratorijskega gnilišča je mogoče najti drugje (11). Če se namerava uporabiti prilagojeni inokulum, je mogoče razmisliti o gnijočem blatu iz čistilne naprave za industrijske odplake. Za zbiranje blata uporabite steklenice s širokim vratom,

([1]) Merilnik je treba uporabljati in v rednih časovnih razmikih kalibrirati v skladu z navodili proizvajalca. Če je uporabljen merilnik tlaka predpisane kakovosti, npr. kapsuliran z jekleno membrano, umerjanje v laboratoriju ni potrebno. V priporočljivih časovnih razmikih ga mora umeriti pooblaščena ustanova. Natančnost umerjanja je mogoče v laboratoriju preveriti z enotočkovno meritvijo pri 1×10^5 Pa v primerjavi z merilnikom tlaka z mehanskim prikazom. Ko je ta točka pravilno izmerjena, bo tudi linearnost nespremenjena. Če se uporabljajo druge merilne naprave (brez potrjene umeritve s strani proizvajalca), se v rednih časovnih razmikih priporoča pretvorba prek celotnega območja (Dodatek 2).

▼M6

izdelane iz polietilena visoke gostote ali podobnega materiala, ki se lahko razteza. Steklenice za vzorce napolnite z blatom do približno 1 cm od vrha steklenic, steklenice dobro zatesnite, po možnosti z varnostnim ventilom (odstavek 12(e)), in jih postavite v izolirane posode (odstavek 12(d)), da kar najbolj zmanjšate možnost temperaturnega šoka; v teh posodah naj stojijo do prenosa v inkubator, v katerem se vzdržuje temperatura 35 °C ± 2 °C. Pri odpiranju steklenic poskrbite, da boste sprostili odvečni tlak plina, tako da previdno sprostite tesnilo ali pa uporabite trojni petelinček za sprostitev tlaka (odstavek 12(e)). Po možnosti blato uporabite v nekaj urah po zbiranju, v nasprotnem primeru ga do 3 dni, ko običajno ne pride do velike izgube aktivnosti, hranite pri temperaturi 35 °C ± 2 °C pod prostorom nad fazno mejo dušik-kapljevina, napolnjenim z dušikom.

Opozorilo – Gnijoče blato proizvaja vnetljive pline, ki povzročajo tveganje za požar in eksplozijo. Vsebuje tudi potencialno patogene organizme, zato pri ravnanju z njim upoštevajte ustrezne previdnostne ukrepe. Za zbiranje blata zaradi varnosti ne uporabljajte steklenih posod.

Inokulum

16. Blato tik pred uporabo rahlo premešajte in ga prek sita z odprtinami velikosti 1 mm^2 (odstavek 12(f)) precedite v primerno steklenico (odstavek 12(g)) skozi prostor nad fazno mejo plin-kapljevina, skozi katerega se pomika tok dušika. Oddelite vzorec za merjenje koncentracije celotne količine suhih trdnih snovi (glej npr. ISO 11923 (13) ali enakovredni standard EU). V splošnem uporabljajte blato brez redčenja. Koncentracija trdnih snovi je običajno med 2 % in 4 % (m/v). Preverite vrednost pH in jo po potrebi prilagodite na 7 ± 0,5.

Preskusni substrat

17. V deionizirani vodi raztopite 10 g hranilnega bujona (npr. bujona Oxoid), 10 g kvasnega ekstrakta in 10 g D-glukoze ter razredčite na 100 ml. Sterilizirajte s filtracijo prek 0,2-mikrometrskega membranskega filtra (odstavek 12(h)) in uporabite takoj ali hranite pri temperaturi 4 °C, vendar največ en dan.

Preskusna kemikalija

18. Pripravite ločeno založno raztopino za vsako vodotopno preskusno kemikalijo, ki bo vsebovala na primer 10 g/l kemikalije v vodi za redčenje brez kisika (odstavek 14). Za pripravo reakcijskih zmesi, ki vsebujejo po stopnjah razvrščene koncentracije, uporabite ustrezne količine teh založnih raztopin. Namesto tega pripravite razredčeno serijo vsake založne raztopine, tako da bo količina, dodana preskusnim steklenicam, enaka za vsako zahtevano končno koncentracijo. Vrednost pH založnih raztopin mora biti po potrebi prilagojena na 7 ± 0,2.

19. Za preskusne kemikalije, ki niso zadostno topne v vodi, upoštevajte standard ISO 10 634 (12) ali enakovredni standard EU. Če je treba uporabiti organsko topilo, se izogibajte topilom, kot sta kloroform in ogljikov tetraklorid, za katera je dobro znano, da zavirajo nastajanje metana. V primernem hlapnem topilu, na primer acetonu ali dietil etru, pripravite raztopino ustrezne koncentracije kemikalije, ki ni topna v vodi. Potrebne količine raztopine topila dodajte v prazne preskusne steklenice (odstavek 12(b)), pred dodajanjem blata pa naj topilo izhlapi. Za druge obdelave uporabite standard ISO 10 634 (12) ali enakovredni standard EU, zavedajte pa se, da lahko morebitne površinsko aktivne snovi, uporabljene za pridobivanje emulzij, zavirajo anaerobno nastajanje plina. Če se zdi, da prisotnost organskih topil in emulgatorjev povzroča artefakte, se preskusna kemikalija lahko doda neposredno v preskusno zmes v obliki prahu ali tekočine. Hlapne kemikalije in v vodi netopne tekoče preskusne kemikalije se lahko z mikrobrizgami vbrizgajo v inokulirane serumske steklenice (odstavek 12(i)).

▼M6

20. Preskusne kemikalije dodajajte v steklenice tako, da boste dobili geometrijsko vrsto koncentracij, na primer 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l in 15,6 mg/l. Če območje strupenosti ni znano na podlagi podobnih kemikalij, najprej izvedite predhodni preskus za določanje območja delovanja s koncentracijami 1 000 mg/l, 100 mg/l in 10 mg/l, da določite ustrezno območje.

Referenčna kemikalija

21. Pripravite vodno raztopino 3,5-diklorofenola (10 g/l), tako da med stresanjem postopno dodajate minimalno količino 5 mol/l raztopine natrijevega hidroksida trdni snovi, dokler se ne raztopi. Nato dodajte deoksigenirano vodo za redčenje (odstavek 14) do zahtevane količine; pri raztapljanju lahko pomaga ultrazvočno razbijanje. Če je v vsaj treh preskusih z različnim inokulumom (različni viri ali različni časi zbiranja) pridobljeno povprečno območje vrednosti EC_{50}, se lahko uporabijo druge referenčne kemikalije.

MOTNJE/NAPAKE

22. Nekatere sestavine blata bi predvidoma lahko reagirale s potencialnimi zaviralci in zato ne bi bile več na voljo mikroorganizmom, zaviranje pa bi bilo manjše ali pa ga ne bi bilo. Če blato že vsebuje kemikalijo, ki je zaviralna, bi bili rezultati napačni, če bi bila ta kemikalija preskušena. Poleg teh možnosti obstaja več drugih ugotovljenih dejavnikov, ki lahko povzročijo napačne rezultate. Ti so našteti v Dodatku 3, skupaj z metodami odpravljanja napak ali vsaj zmanjševanja števila napak.

PRESKUSNI POSTOPEK

23. Število potrebnih ponovitev je odvisno od stopnje natančnosti, zahtevane za kazalnike zaviranja. Če so tesnila na steklenicah med trajanjem preskusa dovolj plinotesna, pripravite le eno serijo (vsaj tri ponovitve) preskusnih steklenic pri vsaki zahtevani koncentraciji. Podobno pripravite eno serijo steklenic z referenčno kemikalijo in en niz kontrol. Če pa so tesnila steklenic zanesljiva le pri enem prebadanju ali nekaj prebadanjih, pripravite serijo preskusnih steklenic (npr. tri ponovitve) za vsak časovni razmik (t), za katerega so rezultati zahtevani za vse koncentracije preskusne kemikalije, namenjene preskušanju. Podobno pripravite „t“ serije steklenic za referenčno kemikalijo in kontrole.

24. Priporočljiva je uporaba komore z rokavicami (odstavek 12(j)). Vsaj 30 minut pred začetkom preskusa skozi komoro z rokavicami, ki vsebuje vso potrebno opremo, zaženite tok dušikovega plina. Poskrbite, da bo med rokovanjem s steklenicami in zatesnjevanjem steklenic temperatura blata v območju 35 °C ± 2 °C.

Predhodni preskus

25. Če aktivnost blata ni znana, je priporočljivo izvesti predhodni preskus. Pripravite kontrole, da dosežete, na primer, koncentracije trdnih snovi 10 g/l, 20 g/l in 40 g/l, ter substrat, vendar ne uporabite preskusne kemikalije. Pripravite tudi različne količine reakcijske zmesi, da pridobite tri ali štiri razmerja količine prostora nad fazno mejo plin-kapljevina in količine tekočine. Iz rezultatov količin plina, nastalih v različnih časovnih razmikih, se izpeljejo najprimernejši pogoji, ki omogočajo dve dnevni merjenji ustvarjenih znatnih količine plina in eno sprostitev tlaka na dan pri optimalni občutljivosti ([1]) brez nevarnosti eksplozij.

Dodajanje preskusnih kemikalij

26. V prazne preskusne steklenice (odstavek 12(b)) dodajte vodotopne preskusne kemikalije v obliki vodnih raztopin (odstavek 18). Uporabite vsaj trojne serije steklenic za vsako območje koncentracij (odstavek 20). Če so preskusne kemikalije netopne ali slabo topne, njihove raztopine v

([1]) To velja za okolje in pogoje poskusa, pri čemer je mogoče iz slepih kontrol in posod, ki kažejo 70–80 % zaviranje, s sprejemljivimi območji napak oceniti količine nastalega plina.

▼M6

organskih topilih z mikrobrizgo injicirajte v prazne steklenice, da boste pridobili serije ponovitev vsake od petih koncentracij preskusne kemikalije. Prek površine raztopin v preskusnih steklenicah spustite curek dušikovega plina, da bo topilo izhlapelo. Namesto tega lahko dodate netopne trdne kemikalije v obliki tehtanih količin trdnih snovi neposredno v preskusne steklenice.

27. Če se tekoče preskusne kemikalije, ki niso topne ali so slabo topne v vodi, ne dodajo s topilom, jih v preskusne steklenice dodajte neposredno z mikrobrizgo po dodajanju inokuluma in preskusnega substrata (glej odstavek 30). Na enak način se lahko dodajajo hlapne preskusne kemikalije.

Dodajanje inokuluma in substrata

28. V 5-litrsko steklenico (odstavek 12(g)) zmešajte ustrezno količino presejanega gnijočega blata (glej odstavek 16), med tem pa skozi prostor nad fazno mejo plin-kapljevina pošiljajte tok dušikovega plina. Preskusne steklenice, ki vsebujejo vodne raztopine ali raztopine preskusnih kemikalij z izhlapelim topilom dve minuti spirajte s tokom dušikovega plina, da odstranite zrak. S pipeto z veliko konico ali z merilnim valjem odmerite alikvote, npr. 100 ml, dobro zmešanega blata v preskusne steklenice. Pipeto morate zaradi lažjega usedanja trdnih snovi iz blata nujno napolniti do točne zahtevane količine blata v enem samem koraku. Če je zajetega več, spraznite pipeto in začnite znova.

29. Nato dodajte zadostno raztopino substrata (odstavek 17), da bo koncentracija hranilnega bujona, kvasnega ekstrakta in D-glukoze v zmesi znašala po 2 g/l vsakega, pri tem pa mora skozi še vedno teči dušik. Naslednje je primer preskusnih serij.

Končna koncentracija preskusne kemikalije v preskusnih steklenicah (mg/l)	Prostornina preskusne kemikalije (ml)		Reagenti in medij (ml)		
	založna raztopina a) 10 g/l odstavek 18	založna raztopina b) 1 g/l odstavek 18	voda za redčenje odstavek 14	inokulum odstavek 16	substrat odstavek 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Celotna prostornina steklenice = 160 ml. Prostornina tekočine = 103 ml
Prostornina plina = 57 ml ali 35,6 % celotne prostornine.

30. Z dušikovim plinom podobno kot prej dobro sperite zadostno število praznih preskusnih steklenic, da odstranite morebitno hlapno in netopno tekočo preskusno kemikalijo (glej odstavek 27).

▼M6

Kontrole in referenčne kemikalije

31. Pripravite vsaj trojne serije steklenic, ki naj vsebujejo samo blato in substrat ter bodo služile kot kontrole. Pripravite dodatne steklenice za ponovitve, ki naj vsebujejo blato in substrat ter dovolj založne raztopine referenčne kemikalije, 3,5-diklorofenola (odstavek 21), da bo končna koncentracija znašala 150 mg/l. Ta koncentracija bi morala zavreti nastajanje plina za približno 50 %. Namesto tega lahko pripravite serijo koncentracij referenčne kemikalije. Poleg tega pripravite štiri dodatne steklenice za merjenje pH, ki bodo vsebovale blato, deoksigenirano vodo in substrat. V dve steklenici dodajte preskusno kemikalijo v največji koncentraciji, ki bo preskušana, v preostali dve steklenici pa dodajte deoksigenirano vodo.

32. Poskrbite, da bodo vse steklenice – s preskusnimi in referenčnimi kemikalijami ter kontrolami – vsebovale enako količino (V_R) tekočine; po potrebi za dopolnjevanje količine dodajte deoksigenirano deionizirano vodo (odstavek 14). Velikost prostora nad fazno mejo plin-kapljevina mora biti med 10 % in 40 % prostornine steklenice, dejansko vrednost pa je treba določiti na podlagi podatkov, pridobljenih iz predhodnega preskusa. Po dodajanju vseh sestavin v steklenice odstranite iglo, skozi katero priteka plin, in zatesnite vsako steklenico z zamaškom iz kavčuka in aluminijastim pokrovčkom (odstavek 12(b)), pri tem pa za lažje vstavljanje navlažite zamašek s kapljico deionizirane vode. S stresanjem zmešajte vsebini obeh steklenic.

Inkubacija steklenic

33. Prenesite steklenice v termostatsko nadzorovan inkubator, po možnosti opremljen s stresalnikom, katerega temperatura je vzdrževana v območju 35 °C ± 2 °C. Steklenice se inkubirajo v temi. Po približno 1 uri izenačite tlak v steklenicah s tlakom ozračja, tako da injekcijsko iglo, pritrjeno na merilnik tlaka (odstavek 12(c)), skozi tesnilo po vrsti vstavite v vsako steklenico, odprete ventil in počakate, da merilnik tlaka prikaže vrednost nič, na koncu pa zaprete ventil. Iglo je treba vstaviti pod kotom približno 45°, da se prepreči uhajanje plina iz steklenic. Če so steklenice inkubirane brez stresalne naprave, jih med inkubacijo vsak dan dvakrat ročno pretresite, da uravnotežite sistem. Steklenice inkubirajte in jih obrnite, da preprečite uhajanje plina skozi zaporko. Vendar pa obračanje v primerih, ko bi se netopne preskusne kemikalije lahko prilepile na dno bučke, ni primerno.

Merjenje tlaka

34. Ko steklenice dosežejo temperaturo 35 °C ± 2 °C, izmerite in zabeležite vrednost pH vsebine dveh od štirih steklenic, pripravljenih v ta namen, in zavrzite vsebino; preostali steklenici še naprej inkubirajte v temi. Dvakrat na dan v naslednjih 48 do 72 urah izmerite in zabeležite tlak v steklenicah, tako da iglo merilnika tlaka po vrsti vstavljate skozi tesnilo vsake steklenice, med merjenji pa iglo osušite. Med merjenjem, ki ga je treba izvesti čim hitreje, ohranjajte temperaturo vseh delov steklenice pri temperaturi inkubacije. Pustite, da se odčitek tlaka stabilizira, in ga zabeležite. Nato odprite ventil za zračenje in ga zaprite, ko odčitani tlak pade na nič. Običajno preskus nadaljujte 48 ur, merjeno od prvega izenačevanja tlaka, kar je označeno s „čas 0“. Število odčitkov in prezračevanj mora biti za hlapne kemikalije omejeno na ena (ob koncu inkubacije) ali dve, da so izgube preskusne kemikalije kar najmanjše (10).

35. Če je odčitek tlaka negativen, ventila ne odpirajte. Včasih se v injekcijski igli in ceveh nabere vlaga, kar se odrazi na odčitku tlaka, ki je rahlo negativen. V tem primeru odstranite iglo, pretresite cevi, jih osušite s krpo in namestite novo iglo.

Merjenje vrednosti pH

36. Po zadnjem merjenju tlaka izmerite in zabeležite vrednost pH vsebine vsake steklenice.

▼M6

PODATKI IN POROČANJE

Prikaz rezultatov

37. Izračunajte vsoto in povprečje tlakov, zabeleženih ob vsakem časovnem razmiku za vsako serijo steklenic za ponovitve ter izračunajte srednjo vrednost kumulativne bruto vrednosti tlaka plina ob vsakem časovnem razmiku za vsako serijo ponovitev. Za steklenice s kontrolno, preskusno in referenčno kemikalijo izrišite krivulje srednje vrednosti kumulativne vrednosti nastajanja plina (Pa) v odvisnosti od časa. Na linearnem delu krivulje izberite čas, običajno je to 48 ur, in iz enačbe [1] izračunajte odstotek zaviranja (I) za vsako koncentracijo:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

pri čemer so:

I odstotek zaviranja v %,

P_t tlak plina, nastalega s preskusnim materialom v izbranem času v paskalih (Pa),

P_c tlak plina, nastalega v kontroli v istem času v paskalih (Pa).

Priporočljivo je izrisati obe krivulji, tj. krivuljo I v odvisnosti od koncentracije in krivuljo I v odvisnosti od logaritma koncentracije, tako da je mogoče izbrati krivuljo, ki je bolj linearna. Vrednost EC_{50} (mg/l) ocenite vizualno ali z regresijsko analizo iz krivulje, ki je bolj linearna. Za primerjavo je morda bolj uporabno izraziti koncentracijo kemikalije v mg kemikalije/g celotne količine suhih trdnih snovi. Da pridobite to koncentracijo, delite volumetrično koncentracijo (mg/l) s prostorninsko koncentracijo suhih trdnih snovi v blatu (g/l) (odstavek 16).

38. Izračunajte odstotek zaviranja, dosežen z eno samo koncentracijo uporabljene referenčne kemikalije, ali vrednost EC_{50}, če je proučenih dovolj koncentracij.

39. Z upoštevanjem umeritvene krivulje merilnika tlaka (Dodatek 2) pretvorite srednjo vrednost tlaka, pridobljenega v kontroli P_c (Pa), v prostornino in iz tega izračunajte prirast plina, izraženo v obliki prostornine, pridobljeno v 48 urah iz 100 ml nerazredčenega blata pri koncentraciji trdnih snovi od 2 % (20 g/l) do 4 % (40 g/l).

Merila za veljavnost

40. Rezultati medlaboratorijske primerjave ISO (5) so dokazali, da je referenčna kemikalija (3,5-diklorofenol) povzročila 50-odstotno zaviranje nastajanja plina v območju koncentracij od 32 mg/l do 510 mg/l s srednjo vrednostjo 153 mg/l (odstavek 10). To območje je tako široko, da trdnih meja za zaviranje ni mogoče z gotovostjo določiti kot merilo za veljavnost; to bi moralo postati mogoče, ko bo napredek pokazal, kako proizvesti bolj skladne inokulume. Prostornina nastalega plina v kontrolnih steklenicah v 48 urah se je gibala od 21 ml/g suhe snovi v blatu do 149 ml/g (srednja vrednost je bila 72 ml/g). Med prostornino nastalega plina in ustrezno vrednostjo EC_{50} ni bilo očitne zveze. Končna vrednost pH se je gibala med 6,1 in 7,5.

41. Preskus šteje kot veljaven, ko je v referenčni kontroli, ki vsebuje 150 mg/l 3,5-diklorofenola, pridobljeno zaviranje večje od 20 %, ko je v slepi kontroli nastalega več kot 50 ml plina na gram suhe snovi in ko je vrednost pH ob koncu preskusa v območju od 6,2 do 7,5.

Poročilo o preskusu

42. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— splošno ime, kemijsko ime, številka CAS, strukturna formula in pomembne fizikalno-kemijske lastnosti,

▼M6

— čistost (nečistote) preskusne kemikalije.

Preskusni pogoji

— prostornine tekočih vsebin in prostora nad fazno mejo plin-kapljevina v preskusnih posodah,

— opisi preskusnih posod in merjenja plina (npr. vrsta merilnika tlaka),

— uporaba preskusne in referenčne kemikalije v preskusnem sistemu, uporabljene preskusne koncentracije in uporaba kakršnih koli topil,

— podrobnosti o uporabljenem inokulumu: ime čistilne naprave, opis vira čiščene odpadne vode (npr. obratovalna temperatura, retencijski čas blata, večinoma gospodinjske ali industrijske odplake itd.), koncentracija trdnih snovi, dejavnost nastajanja plina pri anaerobnem gnilišču, predhodna izpostavljenost ali morebitna predhodna prilagoditev strupenim kemikalijam ali mesto zbiranja blata, usedlin itd.,

— inkubacijska temperatura in območje,

— število ponovitev.

Rezultati:

— vrednosti pH na koncu preskusa,

— vsi izmerjeni podatki, zbrani v kontrolnih posodah s preskusno, slepo in referenčno kemikalijo, kot je ustrezno (npr. tlak v Pa ali milibarih), v preglednici,

— odstotek zaviranja v preskusnih in referenčnih steklenicah ter krivulje zaviranje-koncentracija,

— izračun vrednosti EC_{50}, izražene v mg/l in mg/g,

— nastajanje plina na gram blata v 48 urah,

— razlogi za morebitno zavrnitev rezultatov preskusa,

— razprava o rezultatih, vključno z morebitnimi odstopanji od postopkov v tej preskusni metodi, in razprava o morebitnih odstopanjih v rezultatih preskusa od tistega, kar bi bilo pričakovano, zaradi motenj in napak,

— poleg tega pa tudi odgovor na vprašanje, ali je bil namen preskusa merjenje strupenosti za predhodno izpostavljene mikroorganizme ali za predhodno neizpostavljene mikroorganizme.

LITERATURA

(1) Poglavje C.11 te priloge: Preskus zaviranja dihanja aktivnega blata.

(2) Poglavje C.43 te priloge: Anaerobna biološka razgradljivost organskih spojin v pregnitem blatu: metoda z merjenjem nastajanja plina.

(3) Mednarodna organizacija za standardizacijo (2003). ISO 13641-1 Kakovost vode – Določevanje zaviranja nastanka plina, ki ga proizvedejo anaerobne bakterije – 1. del: Splošen preskus.

(4) Mednarodna organizacija za standardizacijo (2003). ISO 13641-2 Kakovost vode – Določevanje zaviranja nastanka plina, ki ga proizvedejo anaerobne bakterije – 2. del: Preskus z nizkimi koncentracijami biomase.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans M. R., Painter, H. A. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA, Združeno kraljestvo.

▼M6

(6) Swanwick, J. D., Foulkes, M. (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58–70.

(7) HMSO (1986). Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, V: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, Združeno kraljestvo.

(8) Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850–857.

(9) Battersby, N. S., in Wilson, V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441–2460.

(10) Wilson, V., Painter, H. A., in Battersby, N. S. (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Nemčija (1990). Ur. Steinberg C. in Kettrup A., str. 117– 132 (1992).

(11) Kawahara, K., Yakabe, Y., Chida, T., in Kida, K. (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007–2018.

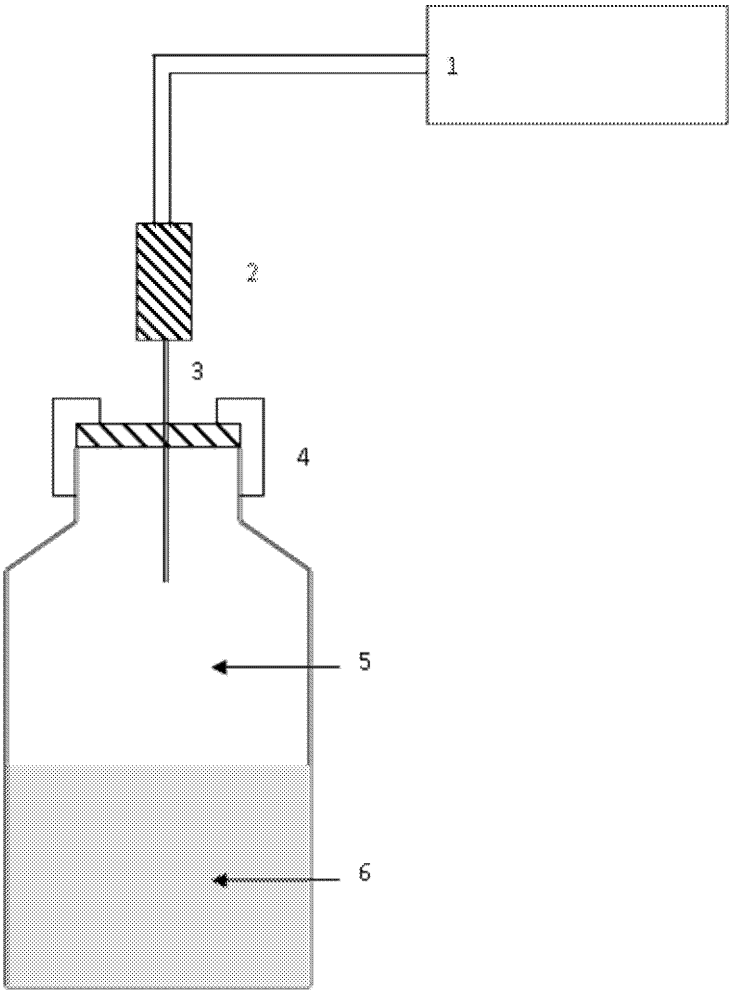
(12) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1995). ISO 10634: Kakovost vode – Navodilo za pripravo in obdelavo v vodi slabo topnih organskih spojin za nadaljnje vrednotenje njihove biorazgradljivosti v vodi.

(13) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1997). ISO 11923: Kakovost vode – Določevanje suspendiranih snovi s filtracijo skozi filter iz steklenih vlaken.

▼**M6**

Dodatek 1

Primer naprave za merjenje nastajanja bioplina s tlakom plina



Legenda:

1 – merilnik tlaka
2 – trojni plinotesni petelinček
3 – injekcijska igla
4 – plinotesno tesnilo (zaporni pokrovček in zaporka)
5 – prostor nad fazno mejo plin-kapljevina
6 – inokulum pregnitega blata

Preskusne posode v okolju s temperaturo 35 °C ± 2 °C.

▼M6

Dodatek 2

Pretvorba odčitkov merilnika tlaka

Odčitki merilnika tlaka so lahko prek umeritvene krivulje povezani s količinami plina, iz tega pa je mogoče izračunati količino nastalega plina na gram suhega blata v 48 urah. Ta kazalnik dejavnosti se uporablja kot eno od meril, s katerimi se ocenjuje veljavnost rezultatov preskusa. Umeritvena krivulja se ustvari z vbrizganjem znanih količin plina pri temperaturi 35 °C ± 2 °C v serumske steklenice, ki vsebujejo toliko vode, kolikor znaša količina reakcijske zmesi, V_R.

— V pet serumskih steklenic odmerite V_R ml alikvotov vode, hranjene pri temperaturi 35 °C ± 2 °C. Steklenice zatesnite in jih za eno uro postavite v vodno kopel pri temperaturi 35 °C ± 2 °C, da se uravnotežijo.

— Vklopite merilnik tlaka, pustite ga, da se stabilizira, in ga nastavite na ničlo.

— Skozi tesnilo ene od steklenic vstavite injekcijsko iglo, odprite ventil in ga pustite odprtega, dokler merilnik tlaka ne pokaže vrednosti nič, nato pa zaprite ventil.

— Postopek ponovite pri preostalih steklenicah.

— V vsako steklenico vbrizgajte 1 ml zraka pri temperaturi 35 °C ± 2 °C. Vstavite iglo (na merilniku) v eno od steklenic in pustite, da se odčitek tlaka stabilizira. Zabeležite tlak, odprite ventil in ga pustite odprtega, dokler tlak ne doseže vrednosti nič, nato pa zaprite ventil.

— Postopek ponovite pri preostalih steklenicah.

— Celoten postopek ponovite z 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml in 50 ml zraka.

— Izrišite krivuljo pretvorbe tlaka (Pa) v odvisnosti od injicirane prostornine (ml). V območju od 0 Pa do 70 000 Pa in od 0 ml do 50 ml nastajanja plina je odziv instrumenta linearen.

▼M6

Dodatek 3

Ugotovljeni dejavniki, ki lahko povzročijo napačne rezultate

(a) *Kakovost pokrovčkov steklenic*

Na trgu so na voljo različne vrste zapork za serumske steklenice; med temi jih v pogojih tega preskusa ob prebadanju z iglo veliko izgubi sposobnost tesnjenja, tudi takšne iz butilnega kavčuka. Včasih po prebadanju zaporke z injekcijsko iglo tlak zelo počasi pada. Za preprečevanje puščanja je priporočena uporaba plinotesnih zapork (odstavek 12(b)).

(b) *Vlaga v injekcijski igli*

V injekcijski igli in ceveh se včasih nakopiči vlaga, kar se odrazi na odčitku tlaka, ki je rahlo negativen. To popravite tako, da odstranite iglo, pretresete cevi, jih osušite s krpo in namestite novo iglo (odstavka 12(c) in 35).

(c) *Kontaminacija s kisikom*

Anaerobne metode so izpostavljene napakam, do katerih pride zaradi kontaminacije s kisikom, kar lahko oslabi nastajanje plina. Pri tej metodi je treba to možnost kar najbolj zmanjšati z uporabo strogo anaerobnih tehnik, vključno z uporabo komore z rokavicami.

(d) *Nepredelani substrati v blatu*

Na anaerobno nastajanje plina in občutljivost blata vplivajo substrati, ki so z inokulumom preneseni v preskusne steklenice. Pregnito blato iz anaerobnih gnilišč čistilnih naprav za gospodinjske odplake pogosto še vedno vsebuje prepoznavne snovi, kot so lasje in ostanki rastlin v obliki celuloze, zaradi česar je jemanje reprezentativnih vzorcev lahko oteženo. S presejanjem blata je mogoče nepredelane netopne snovi odstraniti, zato je verjetnost, da bo vzorčenje reprezentativno, večja (odstavek 16).

(e) *Hlapne preskusne kemikalije*

Hlapne preskusne kemikalije bodo sproščene v prostor v preskusnih steklenicah, ki je nad fazno mejo plin-kapljevina. Pri tem lahko med prezračevanjem po meritvah tlaka pride do izgube nekaj preskusnega materiala iz sistema, kar daje lažno visoke vrednosti EC_{50}. Napako je mogoče zmanjšati s primerno izbiro razmerja med prostornino prostora nad fazno mejo plin-kapljevina in prostornino tekočine ter s tem, da po merjenju tlaka ne zračimo (10).

(f) *Nelinearnost nastajanja plina*

Če krivulja srednje vrednosti kumulativne vrednosti nastajanja plina v odvisnosti od časa inkubacije v obdobju 48 ur ni približno linearna, se je natančnost preskusa morda zmanjšala. Da ne pride do tega, je morda priporočljiva uporaba gnijočega blata iz drugega vira in/ali dodajanje povečane koncentracije preskusnega substrata/hranilnega bujona, kvasnega ekstrakta in glukoze (odstavek 29).

▼M6

Dodatek 4

Uporaba pri okoljskih vzorcih z nizko koncentracijo biomase – anaerobnih blatih, usedlinah itd.

UVOD

A.1 V splošnem je specifična mikrobna dejavnost (količina plina, nastalega na gram suhih trdnih snovi) pri naravno nastalih anaerobnih blatih, usedlinah itd. precej nižja od mikrobne dejavnosti pri anaerobnem blatu, pridobljenem iz odplak. Zato je treba pri merjenju zaviralnih učinkov kemikalij na te manj dejavne vzorce spremeniti nekatere pogoje poskusa. Pri teh manj dejavnih vzorcih sta možna dva poteka delovanja:

(a) izvedite prilagojen predhodni preskus (odstavek 25) z nerazredčenim vzorcem blata, tal itd. pri temperaturi 35 °C ± 2 °C ali, za natančnejšo simulacijo, pri temperaturi mesta zbiranja vzorcev (kot v 1. delu standarda ISO 13641);

(b) lahko pa izvedete preskus z razredčenim blatom iz gnilišča (v razmerju 1 proti 100), da posnamete šibko delovanje, pričakovano pri okoljskem vzorcu, vendar temperaturo vzdržujte v območju 35 °C ± 2 °C (kot v 2. delu standarda ISO 13641).

A.2 Možnost (a) je mogoče doseči z upoštevanjem tu opisane metode (enakovredne 1. delu standarda ISO 13641), nujno pa je izvesti predhodni preskus (odstavek 25) za določanje optimalnih pogojev, razen če so ti že znani iz prejšnjih preskusov. Vzorec blata ali usedline je treba temeljito zmešati, npr. v mešalniku, in ga po potrebi razredčiti z majhnim delom razplinjene vode za redčenje (odstavek 14), tako da je dovolj tekoč za prenos s široko pipeto ali merilnim valjem. Če se zdi, da bi utegnila manjkati hranila, se vzorec blata lahko centrifugira (v anaerobnih pogojih) in ponovno suspendira v mineralnem mediju, ki vsebuje kvasni ekstrakt (A.11).

A.3 Možnost (b). Ta možnost v razumni meri posnema šibko aktivnost okoljskih vzorcev, vendar ji manjka visoka koncentracija suspendiranih trdnih snovi, ki so prisotne v teh vzorcih. Vloga teh trdnih snovi pri zaviranju ni znana, vendar je mogoče, da bi lahko zaradi reakcije med preskusnimi kemikalijami in sestavinami blata ter adsorpcije preskusnih kemikalij na trdne snovi prišlo do zmanjšanja strupenosti preskusne kemikalije.

A.4 Naslednji pomemben dejavnik je temperatura: za natančno simulacijo je treba preskuse izvesti pri temperaturi mesta zbiranja vzorcev, saj je znano, da različne skupine združb bakterij, ki proizvajajo metan, delujejo v različnih temperaturnih območjih, namreč termofili (~30–35 °C), mezofili (20–25 °C) in psihrofili (< 20 °C), in lahko izkazujejo različne vzorce zaviranja.

A.5 Trajanje. V 1. delu splošnega preskusa z uporabo nerazredčenega blata je bilo nastajanje plina v obdobju 2–4 dni vedno zadostno, v 2. delu z blatom, razredčenim na eno stotino, pa v tem obdobju v krožnem preskusu plin ni nastal ali pa ga ni nastalo dovolj. Pri opisovanju slednjega preskusa Madsen in drugi (1996) pravijo, da mora trajati vsaj 7 dni.

Preskušanje z nizko koncentracijo biomase (možnost b)

Z dodajanjem ali menjavo nekaterih obstoječih odstavkov in pododstavkov v glavnem besedilu je treba izvesti naslednje preureditve in spremembe:

▼**M6**

A.6 Dodatek k odstavku 6: Načelo preskusa;

„To tehniko je mogoče uporabiti z anaerobnim blatom, razredčenim v razmerju 1 proti 100, deloma za posnemanje šibkega delovanja blat in usedlin. Temperatura inkubacije je lahko enaka 35 °C ali pa enaka temperaturi na mestu, na katerem je bil vzorec odvzet. Ker je delovanje bakterij precej šibkejše od tistega v nerazredčenem blatu, je treba obdobje inkubacije podaljšati na vsaj 7 dni.“

A.7 Dodatek k odstavku 12 (a):

„inkubator mora biti zmožen delovati tudi pri nižjih temperaturah, in sicer do 15 °C.“

A.8 Dodatek dodatnega reagenta za odstavkom 13:

„Fosforna kislina (H_3PO_4), 85 mas. % v vodi.“

A.9 Dodatek na koncu odstavka 16:

„Uporabite končno koncentracijo 0,20 ± 0,05 g/l celotne količine suhih trdnih snovi v preskusu.“

A.10 Odstavek 17. Preskusni substrat

Ta substrat se ne sme uporabljati, nadomesti ga kvasni ekstrakt (glej odstavke 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Za redčenje anaerobnega blata je potreben mineralni medij, vključno z elementi v sledovih, temu mediju pa je zaradi pripravnosti dodan organski substrat, kvasni ekstrakt.

Dodatek za odstavkom 17:

„(a) Preskusni mineralni medij s kvasnim ekstraktom.

Pripravljen je z 10-kratno koncentriranim preskusnim medijem (odstavek 17 (b); A.12) z raztopino elementov v sledovih (odstavek 17(c); A.13). Uporabite sveže dobavljen natrijev sulfid nonahidrat (odstavek 17(b); A.12), če ni svež, pa ga pred uporabo operite in posušite, da mu zagotovite zadostno redukcijsko sposobnost. Če se preskus izvaja brez komore z rokavicami (odstavek 12(j)), je treba koncentracijo natrijevega sulfida v založni raztopini povečati na 2 g/l (z 1 g/l). Natrijev sulfid se lahko za pridobivanje končne koncentracije 0,2 g/l doda tudi iz ustrezne založne raztopine prek zaporke zaprtih preskusnih steklenic, saj se s tem postopkom zmanjša tveganje oksidacije. Namesto tega se lahko uporabi titanov (III) citrat (odstavek 17(b)). Dodajte ga skozi zaporko zaprtih preskusnih steklenic, da dobite koncentracijo od 0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l. Titanov (III) citrat je visoko učinkovit reducent z nizko strupenostjo, ki se pripravi, kot je opisano v nadaljevanju: 2,94 g trinatrijevega citrata dihidrata raztopite v 50 ml vode za redčenje brez kisika (odstavek 14) (kar da raztopino 200 mmol/l) in dodajte 5 ml raztopine titanovega (III) klorida (15 g/100 ml vode za redčenje). Z natrijevim karbonatom nevtralizirajte na vrednost pH 7 ± 0,5 in pod tokom dušikovega plina odmerite v ustrezno serumsko steklenico. Koncentracija titanovega (III) citrata v tej založni raztopini je 164 mmol/l. Preskusni medij uporabite takoj ali pa ga največ en dan hranite pri temperaturi 4 °C.

A.12 (b) Desetkratno koncentrirani preskusni medij, pripravljen z naslednjim:

brezvodnim kalijevim dihidrogenfosfatom (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatrijevim hidrogenfosfatom (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ali 11,2 g dodekahidrata)	5,3 g
amonijevim kloridom (NH_4Cl)	

▼**M6**

kalcijevim klorid dihidratom ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnezijevim klorid heksahidratom ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
železovim (II) klorid tetrahidratom ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurinom (redoks indikatorjem)	0,01 g
natrijevim sulfid nonahidratom ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(ali titanovim (III) citratom) končna koncentracija	od 0,8 mmol/l do 1,0 mmol/l
raztopino elementov v sledovih (glej odstavek 17 (c); A.13)	10,0 ml
kvasnim ekstraktom	100 g
Raztopite v vodi za redčenje (odstavek 14) in dopolnite do:	1 000 ml

A.13 (c) Raztopina elementov v sledovih, pripravljena z naslednjim:

manganovim (II) klorid tetrahidratom ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoborovo kislino (H_3BO_3)	0,05 g
cinkovim kloridom ($ZnCl_2$)	0,05 g
bakrovim (II) kloridom ($CuCl_2$)	0,03 g
natrijevim molibdat dihidratom ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kobaltovim (II) klorid heksahidratom ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nikljevim (II) klorid heksahidratom ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatrijevim selenitom (Na_2SeO_3)	0,05 g
Raztopite v vodi za redčenje (odstavek 14) in dopolnite do:	1 000 ml“

A.14 Odstavek 25: Predhodni preskus

Nujno mora biti opravljen predhodni preskus, kot je opisan v odstavku 24, razen tega, da mora biti koncentracija trdnih snovi v blatu ena stotina podanih koncentracij, tj. 0,1 g/l, 0,2 g/l in 0,4 g/l. Inkubacija mora trajati najmanj 7 dni.*Opomba:* v krožnem preskusu (5) je bil prostor nad fazno mejo plin-kapljevina pri 75 % celotne prostornine precej prevelik; biti mora v priporočenem območju od 10 % do 40 %. Ustrezno merilo je, da mora biti prostornina plina, nastalega pri približno 80-odstotnem zaviranju, merljiva s sprejemljivo natančnostjo (npr. od ± 5 % do ± 10 %).

A.15 Odstavki od 26 do 30: Dodajanje preskusne kemikalije, inokuluma in substrata.

Dodajanje se izvaja na enak način, kot je opisano v teh odstavkih, raztopino substrata (odstavek 17) pa nadomestita preskusni medij in substrat kvasnega ekstrakta (A.11).

Poleg tega je končna koncentracija suhih trdnih snovi v blatu zmanjšana z območja 2–4 g/l na območje 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Dva primera dodajanja sestavin preskusni zmesi sta podana v preglednici A.1, ki nadomesti preglednico v odstavku 29.

A.16 Odstavek 33: Inkubacija steklenic

Zaradi pričakovane manjše hitrosti nastajanja plina se inkubacija izvaja vsaj 7 dni.

▼**M6**

A.17 Odstavek 34: Meritve tlaka

Če so zahtevane količine v plinski fazi, se za merjenje tlaka v prostoru steklenic nad fazno mejo plin-kapljevina uporablja enak postopek, kot je opisan v odstavku 34. Če bodo izmerjene celotne količine CO_2 in CH_4, se vrednost pH tekoče faze z vbrizganjem H_3PO_4 v vsako ustrezno steklenico in merjenjem tlaka po 30 minutah stresanja pri temperaturi preskusa zmanjša na približno 2. Vendar je mogoče več informacij o kakovosti inokuluma pridobiti z merjenjem tlaka v vsaki steklenici pred zakisljevanjem in po njem. Če je, na primer, hitrost nastajanja CO_2 precej višja od hitrosti nastajanja metana, se lahko občutljivost fermentacijskih bakterij spremeni in/ali na metanogene bakterije po možnosti vpliva preskusna kemikalija.

A.18 Odstavek 36: Merjenje vrednosti pH

Če bo uporabljen H_3PO_4, je treba posebej za merjenje vrednosti pH pripraviti nekaj dodatnih steklenic brez dodanega H_3PO_4.

VIR:

Madsen, T., Rasmussen, H. B., in Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Projekt št. 336, Inštitut za kakovost vode, Danska agencija za varstvo okolja, Köbenhavn.

Preglednica A.1

Primeri priprave preskusa za serije preskusov

Sestavine reakcijske zmesi	Primer 1	Primer 2	Običajni vrstni red dodajanja
koncentracija pripravljenega inokuluma (g/l)	0,42	2,1	—
prostornina dodanega inokuluma (ml)	45	9	4
koncentracija inokuluma v preskusnih steklenicah (g/l)	0,20	0,20	—
prostornina dodanega preskusnega medija (ml)	9	9	2
prostornina dodane vode za redčenje (ml)	36	72	3
koncentracija kvasnega ekstrakta v preskusnih steklenicah (g/l)	9,7	9,7	—
prostornina založne raztopine preskusne kemikalije (ml)	3	3	1
celotna prostornina tekočine (ml)	93	93	—

▼**M6**

Dodatek 5

Opredelitve pojmov

Za to preskusno metodo se uporabljata naslednji opredelitvi:

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M6

C.35 **PRESKUS STRUPENOSTI Z VRSTO *LUMBRICULUS* V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO USEDLIN S PRIMEŠANO PRESKUSNO KEMIKALIJO**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 225 (2007). Endobentoške živali, ki se hranijo z usedlinami, so lahko zelo izpostavljene kemikalijam, ki se vežejo z usedlinami, zato jih je treba obravnavati prednostno, npr. (1), (2), (3). Med temi uživalci usedlin imajo pomembno vlogo pri usedlinah vodnih sistemov vodni maloščetinci. Z bioturbacijo usedline in s tem, ko služijo kot plen, imajo te živali lahko močan vpliv na biološko razpoložljivost takšnih kemikalij za druge organizme, npr. bentivore vrste rib. V nasprotju z epibentoškimi organizmi se endobentoški vodni maloščetinci (npr. vrsta *Lumbriculus variegatus*) zakopljejo v usedlino in jedo delce usedline pod površino usedline. S tem je zagotovljena izpostavljenost preskusnih organizmov preskusni kemikaliji prek vseh mogočih načinov privzema (npr. s stikom z kontaminiranimi delci usedline in z zaužitjem teh delcev, pa tudi prek porne vode in vode nad usedlino).

2. Ta metoda je zasnovana za ocenjevanje učinkov podaljšane izpostavljenosti endobentoških maloščetincev vrste *Lumbriculus variegatus* (Müller) kemikalijam, povezanim z usedlinami. Temelji na obstoječih protokolih za preskušanje strupenosti usedline in kopičenja v organizmih, npr. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoda je opisana za statične preskusne pogoje. Scenarij izpostavljenosti, uporabljen v tej preskusni metodi, je primešanje preskusne kemikalije v usedlino. Uporaba usedline s primešano preskusno kemikalijo poskuša posnemati usedlino, kontaminirano s preskusno kemikalijo.

3. Kemikalije, ki jih je treba preskusiti v zvezi z organizmi, živečimi v usedlinah, se običajno v tem delu obdržijo zelo dolgo. Organizmi, živeči v usedlinah, so lahko izpostavljeni na številne načine. Relativni pomen vsakega načina izpostavljenosti in čas, da ta prispeva k skupnim strupenim učinkom, sta odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti zadevne kemikalije in njene končne usode v živali. Pri kemikalijah, ki se močno adsorbirajo (npr. z log K_{ow} > 5), ali kemikalijah, ki se kovalentno vežejo na usedlino, je lahko zaužitje kontaminirane hrane pomemben način izpostavljenosti. Da ne bi podcenili strupenosti takšnih kemikalij, se usedlini pred nanosom preskusne kemikalije doda hrana, potrebna za razmnoževanje (11). Opisana preskusna metoda je predstavljena dovolj podrobno, da je mogoče izvesti preskus, pri tem pa omogočiti prilagoditve načrta poskusa glede na pogoje v posameznih laboratorijih in različne lastnosti preskusnih kemikalij.

4. Cilj preskusne metode je določitev učinkov preskusne kemikalije na razmnoževanje in biomaso preskusnih organizmov. Merjena biološka parametra sta celotno število preživelih črvov in biomasa (suha teža) ob koncu izpostavljenosti. Ti podatki se nato za oceno koncentracije, ki bi povzročila x-odstotni učinek (npr. EC_{50}, EC_{25} in EC_{10}), analizirajo z regresijskim modelom, za določitev koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) in najnižje koncentracije z opaznim učinkom (LOEC) pa s preskušanjem statističnih domnev.

5. V poglavju C.27 te priloge, „Preskus strupenosti s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo usedline s primešano preskusno snovjo“ (6) je veliko ključnih in uporabnih podrobnosti za izvedbo predstavljene metode preskusa strupenosti usedline. Zato ta dokument služi kot osnova, na podlagi katere so bile izdelane spremembe, potrebne za izvajanje preskusov strupenosti z uporabo usedline z vrsto *Lumbriculus variegatus*. Nadaljnji dokumenti, ki so navedeni, so npr. Standardne smernice ASTM za določanje bioakumulacije

▼M6

z usedlinami povezanih onesnaževal v bentoških nevretenčarjih (3), Metode US EPA za merjenje strupenosti in bioakumulacije z usedlinami povezanih onesnaževal v sladkovodnih nevretenčarjih (7) in Standardne smernice ASTM za zbiranje, shranjevanje, določanje lastnosti in postopke ravnanja z usedlinami za toksikološko preskušanje ter izbiro vzorčevalnikov, uporabljenih za zbiranje bentoških nevretenčarjev (12). Poleg tega so pomembni viri informacij za sestavljanje tega dokumenta tudi praktične izkušnje, pridobljene med krožnim preskušanjem preskusne metode ((13), poročilo o krožnem preskusu), in podrobnosti iz literature.

OSNOVNI POGOJI IN NAPOTKI

6. Pred začetkom študije je treba pridobiti informacije o preskusni kemikaliji, kot so varnostni ukrepi, ustrezni pogoji shranjevanja in analitske metode. Smernice za preskušanje kemikalij s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, zaradi katerih je preskušanje oteženo, so navedene v (14).

7. Pred izvedbo preskusa morajo biti znane naslednje informacije o preskusni kemikaliji:

— splošno ime, kemijsko ime (po možnosti ime IUPAC), strukturna formula, registrska številka CAS, čistost,

— parni tlak,

— topnost v vodi.

8. Pred začetkom preskusa za koristne veljajo tudi naslednje dodatne informacije:

— porazdelitveni koeficient oktanol/voda, K_{ow},

— porazdelitveni koeficient organski ogljik/voda, izražen z vrednostjo K_{oc},

— hidroliza,

— fototransformacija v vodi,

— biorazgradljivost,

— površinska napetost.

9. Informacije o določenih lastnostih usedline, ki bodo uporabljene, je treba pridobiti pred začetkom preskusa (7). Za podrobnosti glej odstavke od 22 do 25.

NAČELO PRESKUSA

10. Črvi v podobnem fiziološkem stanju (sinhronizirani, kot je opisano v Dodatku 5) se izpostavijo seriji koncentracij strupene snovi, nanesene na fazo usedline sistema vode in usedline. Kot medij morata biti uporabljeni umetna usedlina in modelna razredčevalna voda. Kot kontrole služijo preskusne posode brez dodatka preskusne kemikalije. Preskusna kemikalija se primeša v usedlino v celoti za vsako raven koncentracije, da se kar najbolj zmanjša variabilnost med ponovitvami vsake ravni koncentracije, preskusni organizmi pa se nato vnesejo v preskusne posode, v katerih so koncentracije usedline in vode uravnotežene (glej odstavek 29). Preskusne živali se za 28 dni izpostavijo sistemu vode in usedline. Z vidika nizke vsebnosti hranil umetne usedline je treba usedlino dopolniti z virom hrane (glej odstavka 22 in 23 ter Dodatek 4), da se zagotovita rast in razmnoževanje črvov v kontroliranih pogojih. Na ta način je zagotovljeno, da so preskusne živali izpostavljene prek vode in usedline, pa tudi prek hrane.

11. Najprimernejša končna točka te vrste študije je vrednost EC_x (npr. EC_{50}, EC_{25} in EC_{10}; učinkovita koncentracija, ki vpliva na x % preskusnih organizmov) za razmnoževanje oziroma biomaso v primerjavi s kontrolo. Vendar

▼M6

je treba opozoriti, da vrednost EC_{50} zaradi visoke negotovosti nizke vrednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{25}) z zelo visokimi 95-odstotnimi mejami zaupanja (npr. (15)) in statistične moči, izračunane med preskušanjem domnev, velja za najbolj robustno končno točko. Poleg tega se lahko izračunata koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) in najnižja koncentracije z opaženim učinkom (LOEC) za biomaso in razmnoževanje, če načrt preskusa in podatki podpirajo te izračune (glej odstavke od 34 do 38). Načrt preskusa bo določen z namenom študije, izpeljavo vrednosti EC × ali NOEC.

REFERENČNO PRESKUŠANJE

12. Pričakovati je, da bo delovanje kontrolnih organizmov v zadostni meri dokazalo sposobnost laboratorija za izvedbo preskusa in, če so na voljo historični podatki, ponovljivost preskusa. Poleg tega se lahko v rednih časovnih razmikih izvedejo referenčni preskusi strupenosti z referenčno strupeno snovjo za oceno občutljivosti preskusnih organizmov. Referenčni preskusi strupenosti, ki trajajo 96 ur in potekajo samo v vodi, lahko zadovoljijo dokažejo občutljivost in stanje preskusnih živali (4)(7). Informacije o strupenosti pentaklorofenola (PCP) v popolnih preskusih (pri 28-dnevni izpostavljenosti usedlini, ki ji je primešana preskusna kemikalija) so vključene v Dodatek 6 in v poročilo o krožnem preskusu preskusne metode (13). Akutna strupenost PCP, ki velja le za vodo, je npr. opisana v (16). Te informacije je mogoče uporabiti za primerjavo občutljivosti preskusnega organizma v referenčnih preskusih s PCP kot referenčno strupeno snovjo. Pri vrsti *L. variegatus* se kot referenčna strupena snov priporoča kalijev klorid (KCl) ali bakrov sulfat ($CuSO_4$) (4)(7). Doslej je bilo določanje meril kakovosti na osnovi podatkov o strupenosti za KCl težavno zaradi pomanjkanja podatkov o vrsti *L. variegatus* v literaturi. Informacije o strupenosti bakra za vrsto *L. variegatus* je mogoče najti v virih od (17) do (21).

VELJAVNOST PRESKUSA

13. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjene naslednje zahteve:

— krožni preskus (13) je dokazal, da se mora pri vrsti *Lumbriculus variegatus* povprečno število živih črvov na ponovitev v kontrolah na koncu izpostavljenosti v primerjavi s črvi na ponovitev na začetku izpostavljenosti povečati za faktor, ki znaša vsaj 1,8,

— vrednost pH vode nad usedlino mora biti ves čas preskusa med 6 in 9,

— koncentracija kisika v vodi nad usedlino med preskusom ne sme znašati manj kot 30 % nasičenosti zraka (air saturation value – ASV) pri preskusni temperaturi.

OPIS PRESKUSNE METODE

Preskusni sistem

14. Priporočajo se statični sistemi brez obnavljanja vode nad usedlino. Če je razmerje vode in usedline (glej odstavek 15) ustrezno, bo rahlo prezračevanje običajno zadoščalo za vzdrževanje količine vode na sprejemljivi ravni za preskusne organizme (ravni raztopljenega kisika npr. kar najbolj povečajte, kopičenje produktov izločanja pa kar najbolj zmanjšajte). Polstatične ali pretočne sisteme z občasnim ali kontinuiranim obnavljanjem vode nad usedlino je mogoče uporabiti le v izjemnih primerih, saj je pričakovati, da redno obnavljanje vode nad usedlino vpliva na kemijsko ravnotežje (npr. na izgube preskusne kemikalije iz preskusnega sistema).

Preskusne posode in naprave

15. Izpostavljanje mora potekati v steklenih čašah s prostornino npr. 250 ml in premerom 6 cm. Uporabljajo se lahko tudi druge posode, vendar morajo zagotavljati primerno globino usedline in vode nad njo. Vsaka posoda mora sprejeti plast formulirane usedline, debelo približno 1,5–3 cm. Razmerje

▼M6

med debelino usedline in globino vode nad njo mora biti 1: 4. Posode morajo imeti primerno prostornino, ki ustreza stopnji obremenitve, tj. s številom dodanih preskusnih črvov na enoto usedline (glej tudi odstavek 39).

16. Preskusne posode in druge naprave, ki bodo prišle v stik s preskusnimi kemikalijami, morajo biti v celoti steklene ali iz drugega kemijsko inertnega materiala. Pri vseh delih opreme se je treba izogibati uporabi materialov, ki se lahko raztopijo, adsorbirajo preskusno kemikalijo ali iz katerih se lahko izlužijo druge kemikalije in ki škodljivo učinkujejo na preskusne živali. Pri vsej opremi, ki ima stik s preskusnim medijem, je treba uporabiti politetrafluoroetilen (PTFE), nerjavno jeklo in/ali steklo. Za organske kemikalije, za katere je znano, da se adsorbirajo na steklo, se lahko zahteva silanizirano steklo. V teh primerih je treba opremo po uporabi zavreči.

Preskusne vrste

17. Preskusna vrsta, uporabljena v tej vrsti študije, je sladkovodni maloščetinec *Lumbriculus variegatus* (Müller). Ta vrsta prenese veliko različnih usedlin ter se pogosto uporablja za preskušanje strupenosti usedlin in bioakumulacije (npr. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)). Treba je poročati o izvoru preskusnih živali, potrditvi identitete vrste (npr. (36)), pa tudi o pogojih gojenja. Če organizmi prihajajo iz internega gojišča, identifikacija vrst pred preskusom ni potrebna.

Gojenje preskusnih organizmov

18. Za zagotavljanje zadostnega števila črvov za izvajanje preskusov strupenosti usedlin je črve priročno stalno gojiti v laboratoriju. Smernice za metode gojenja vrste *Lumbriculus variegatus* v laboratoriju in viri začetnih kultur so podani v Dodatku 5. Za podrobnosti o gojenju te vrste glejte vire (3), (7), (27).

19. Za zagotovitev, da se preskusi izvajajo z živalmi iste vrste, je močno priporočljiva priprava kulture ene same vrste. Poskrbite, da kulture in še posebej črvi, uporabljeni v preskusih, ne bodo imeli vidnih bolezni in anomalij.

Voda

20. Za uporabo v preskusih je kot voda nad usedlino priporočljiva modelna razredčevalna voda v skladu s poglavjem C.1 te priloge (37); mogoče jo je uporabljati tudi za laboratorijske kulture črvov (za pripravo glej Dodatek 2). Po potrebi je mogoče uporabiti naravno vodo. Izbrana voda mora biti take kakovosti, ki omogoča rast in razmnoževanje preskusnih organizmov med aklimatizacijo in preskušanjem, ne da bi bili pri tem videti nenormalno ali bi se nenormalno vedli. Dokazano je, da vrsta *Lumbriculus variegatus* v tej vrsti vode preživi, raste in se razmnožuje (30), omogočena pa je tudi kar največja standardizacija preskusnih pogojev in pogojev gojenja. Če se uporablja rekonstituirana voda, je treba poročati o njeni sestavi, pred uporabo pa je treba določiti njene lastnosti, vsaj vrednost pH, vsebnost kisika in trdoto (izraženo v mg $CaCO_3$/l). Uporabne informacije lahko prispeva tudi analiza vode pred uporabo glede na mikro onesnaževala (glej, npr., Dodatek 3).

21. Vrednost pH vode nad usedlino mora biti v območju od 6,0 do 9,0 (glej odstavek 13). Če je pričakovan povečan razvoj amonijaka, velja za uporabno, da se vrednost pH vzdržuje med 6,0 in 8,0. Za preskušanje npr. šibkih organskih kislin je priporočljivo uravnati vrednost pH z dodajanjem pufra vodi, ki bo uporabljena v preskusu, kot je opisano npr. v (16). Skupna trdota vode, uporabljene v preskusu, mora biti za naravno vodo med 90 in 300 mg $CaCO_3$ na liter. V Dodatku 3 so povzeta dodatna merila za sprejemljivo vodo za redčenje v skladu s Smernico za preskušanje OECD št. 210 (38).

▼M6

Usedlina

22. Ker nekontaminirane naravne usedline iz določenega vira niso nujno na voljo vse leto in ker lahko domorodni organizmi in prisotna mikroonesnaževala vplivajo na preskus, je treba po možnosti uporabljati formulirano usedlino (imenovano tudi rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina). Uporaba formulirane usedline kar najbolj zmanjša variabilnost preskusnih pogojev in vnos domorodnih živali. Naslednja formulirana usedlina temelji na umetni usedlini v skladu s (6), (39) in (40). Priporočena je za uporabo v tej vrsti preskusa ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

(a) 4–5 % šotnega mahu (suha teža); pomembno je uporabiti šoto v obliki prahu, stopnja razpada: „srednja“, fino mleto (velikost delcev ≤ 0,5 mm) in posušeno samo na zraku;

(b) 20 ± 1 % kaolinske gline (suha teža) (vsebnost kaolinita po možnosti nad 30 %);

(c) 75–76 % kremenovega peska (suha teža) (fin pesek, velikost zrn: ≤ 2 mm, vendar mora > 50 % delcev meriti med 50 in 200 μm);

(d) deionizirana voda, 30–50 % suhe teže usedline poleg sestavnih delov suhe usedline;

(e) kemijsko čist kalcijev karbonat ($CaCO_3$) za uravnavo vrednosti pH v končni mešanici;

(f) skupna vsebnost organskega ogljika v končni mešanici mora biti 2 % (± 0,5 %) suhe teže usedline, uravnava pa se z ustreznimi količinami šote in peska v skladu s točkama (a) in (c);

(g) hrana, npr. uprašeni listi velike koprive (vrsta Urtica, v skladu s farmacevtskimi standardi, za prehrano ljudi) ali zmes uprašenih listov vrste Urtica in alfa celuloze (v razmerju 1: 1), pri 0,4–0,5 % suhe teže usedline poleg sestavnih delov suhe usedline; za podrobnosti glej Dodatek 4.

23. Vir šote, kaolinske gline, hrane in peska mora biti znan. Poleg točke g) je v poglavju C.27 te priloge (6) naštet alternativni rastlinski material, ki bo uporabljen kot vir prehrane: posušeni listi bele murve (*Morus alba*), plazeče detelje (*Trifolium repens*), špinače (*Spinacia oleracea*) ali žitne trave.

24. Izbrani vir hrane mora biti dodan pred primešanjem preskusne kemikalije usedlini ali med njim. Izbrani vir hrane mora v kontrolah omogočati vsaj še sprejemljivo razmnoževanje. Analiza umetne usedline ali njenih sestavin glede mikro onesnaževal pred uporabo bi lahko dala koristne informacije. Primer priprave formulirane usedline je opisan v Dodatku 4. Sprejemljiva je tudi mešanica suhih sestavin, če se dokaže, da se sestavine usedline po dodatku vode nad usedlino ne začnejo ločevati (da npr. šotni delci ne lebdijo) in da je šota ali usedlina zadostno kondicionirana (glej tudi odstavek 25 in Dodatek 4). Lastnosti umetne usedline morajo biti določene vsaj z virom sestavin, porazdelitvijo zrn glede na velikost (odstotkom peska, mulja in gline), skupno vsebnostjo organskega ogljika, vsebnostjo vode in vrednostjo pH. Merjenje redoks potenciala je neobvezno.

25. Po potrebi, npr. za posebne namene preskušanja, lahko kot preskusna in/ali gojitvena usedlina služijo tudi naravne usedline z nekontaminiranih mest (3). Vendar pa je treba naravni usedlini, če bo uporabljena, določiti značilnosti vsaj glede izvora (mesta zbiranja), vrednosti pH in amonijaka porne vode,

▼M6

skupne vsebnosti organskega ogljika (TOC) in vsebnosti dušika, porazdelitve delcev glede na velikost (odstotka peska, mulja in gline) in deleža vsebnosti vode (7), biti pa mora tudi nekontaminirana in ne sme vsebovati nobenih drugih organizmov, ki bi lahko tekmovali s preskusnimi ali jih plenili. Meritev redoks potenciala in sposobnosti izmenjave kationov je neobvezna. Prav tako se priporoča, naj se naravna usedlina pred primešanjem preskusne kemikalije sedem dni kondicionira v enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu. Ob koncu tega obdobja kondicioniranja je treba vodo nad usedlino odstraniti in zavreči.

26. Voda, ki bo uporabljena, mora biti take kakovosti, ki omogoča preživetje in razmnoževanje kontrolnih organizmov med obdobjem izpostavljenosti, ne da bi bili pri tem videti nenormalno ali bi se nenormalno vedli. Kontrolni črvi se morajo zakopati v usedlino in jo uživati. Razmnoževanje v kontrolah mora biti vsaj takšno, kot ga določa merilo za veljavnost, opisano v odstavku 13. Prisotnost ali odsotnost iztrebkov na površini usedline, ki kaže, da črvi uživajo usedlino, mora biti zabeležena in lahko pomaga pri razlagi rezultatov preskusa v zvezi s potmi izpostavljenosti. Dodatne informacije o uživanju usedline je mogoče pridobiti z uporabo metod, opisanih v (24), (25), (44) in (45), ki podrobno opisujejo uživanje usedline ali izbiro delcev pri preskusnih organizmih.

27. Postopki ravnanja z naravnimi usedlinami pred uporabo v laboratoriju so opisani v (3), (7) in (12). Priprava in shranjevanje umetne usedline, priporočene za uporabo v preskusu z vrsto *Lumbriculus*, je opisana v Dodatku 4.

Uporaba preskusne kemikalije

28. Preskusna kemikalija se primeša usedlini. Ker se pričakuje, da je večina preskusnih kemikalij slabo topna v vodi, jih je za pripravo založne raztopine treba raztopiti v primernem organskem topilu (npr. acetonu, n-heksanu, cikloheksanu) v čim manjši količini. Založna raztopina mora biti za pripravo preskusnih raztopin razredčena z enakim topilom. Strupenost in hlapnost topila ter topnost preskusne kemikalije v izbranem topilu bi morale biti glavna merila za izbiro primernega sredstva za raztapljanje. Za vsako raven koncentracije mora biti uporabljena enaka količina ustrezne raztopine. Preskusna kemikalija se primeša v usedlino v celoti za vsako raven koncentracije, da se kar najbolj zmanjša variabilnost med ponovitvami vsake ravni koncentracije preskusne kemikalije. Vsaka od preskusnih raztopin se nato zmeša s kremenovim peskom, kot je opisano v odstavku 22 (npr. 10 g kremenovega peska na preskusno posodo). Ugotovljeno je, da količina 0,20–0,25 ml na gram peska zadošča za to, da je kremenov pesek v celoti namočen. Nato morajo topila izhlapeti do suhega stanja. Za kar najmanjše izgube preskusne kemikalije zaradi hkratnega izhlapevanja (npr. odvisnega od parnega tlaka kemikalije) mora biti prevlečeni pesek uporabljen takoj po sušenju. Suhi pesek se zmeša s primerno količino formulirane usedline z ustrezno ravnjo koncentracije. Upoštevati je treba količino peska, prinesenega z mešanico preskusne kemikalije in peska (usedlino je torej treba pripraviti z manj peska). Glavna prednost tega postopka je, da v usedlino ni vnesenega skoraj nič topila (7). Namesto tega se lahko, npr. pri naravni usedlini, preskusna kemikalija doda s primešanjem posušenega in fino zmletega dela usedline, kot je zgoraj opisano za kremenov pesek, ali pa z vmešanjem preskusne kemikalije v vlažno usedlino, pri čemer nato kakršno koli uporabljeno sredstvo za raztapljanje izhlapi. Paziti je treba, da je preskusna kemikalija, dodana usedlini, v njej temeljito in enakomerno razporejena. Po potrebi je mogoče za potrditev ciljnih koncentracij v usedlini in določanje stopnje homogenosti analizirati podvzorce. Za potrditev ciljnih koncentracij v usedlini je lahko uporabna tudi analiza podvzorcev

▼M6

preskusnih raztopin. Ker je za prevlečenje kremenovega peska s preskusno kemikalijo uporabljeno topilo, je treba uporabiti kontrolo s topilom, pripravljeno z enako količino topila, kot je uporabljena pri preskusnih usedlinah. Poročati je treba o metodah, uporabljenih za primešanje, in razlogih za izbiro določenega postopka primešanja, ki ni enak zgoraj opisanemu. Metode primešanja je mogoče prilagoditi fizikalno-kemijskim lastnostim preskusne kemikalije, npr. za preprečevanje izgub zaradi izhlapevanja med primeševanjem ali uravnoteževanjem. Dodatne smernice o postopkih primešanja so podane v Environment Canada (1995) (46).

29. Ko je usedlina s primešano preskusno kemikalijo pripravljena, porazdeljena v ponovitvene preskusne posode in je vanjo dotočena preskusna voda, je zaželeno, da se omogoči porazdelitev preskusne kemikalije iz usedline v vodno fazo (npr. (3)(7)(9)). To je po možnosti treba storiti v temperaturnih in prezračevalnih pogojih, ki bodo uporabljeni v preskusu. Ustrezen čas za uravnoteženje je odvisen od značilnosti usedline in kemikalije, lahko pa traja od več ur do več dni in v redkih primerih do več tednov (4–5 tednov) (npr. (27)(47)). V tem preskusu se ne čaka na uravnoteženje, temveč se za to priporoča obdobje od 48 ur do 7 dni. Tako bo čas za razgradnjo preskusne kemikalije najkrajši. Usedlino s primešano preskusno kemikalijo je, odvisno od namena študije, npr. če je treba posnemati okoljske pogoje, mogoče uravnoteževati ali starati preko daljšega obdobja.

30. Ob koncu obdobja za uravnoteženje je treba vzeti vsaj vzorce vode nad usedlino in glavnine usedline za analizo koncentracije preskusne kemikalije ter vsaj pri najvišji koncentraciji in nižji koncentraciji. Te analitske določitve preskusne kemikalije morajo omogočati izračun masne bilance in izražanje rezultatov na podlagi izmerjenih začetnih koncentracij. V splošnem vzorčenje moti ali uniči sistem vode in usedline. Zato navadno ni mogoče uporabiti istih ponovitev za vzorčenje usedlin in črvov. Pripraviti je treba dodatne „analitske“ posode, ki bodo obdelane na enak način (vključno s prisotnostjo preskusnih organizmov), vendar se ne bodo uporabile za biološka opazovanja. Dimenzije posod je treba izbrati tako, da bodo omogočale količine vzorcev, ki jih zahteva analitska metoda. Podrobnosti vzorčenja so navedene v odstavku 53.

IZVEDBA PRESKUSA

Predhodni preskus

31. Če informacije strupenosti preskusne kemikalije za vrsto *Lumbriculus variegatus* niso na voljo, je lahko koristna izvedba predhodnega preskusa za določanje območja koncentracij, ki bodo preskušene v dokončnem preskusu, in za optimizacijo preskusnih pogojev dokončnega preskusa. Za ta namen se uporabi niz široko razmaknjenih koncentracij preskusne kemikalije. Črvi so izpostavljeni vsaki koncentraciji preskusne kemikalije v obdobju (npr. 28 dni, kot v dokončnem preskusu), ki omogoča oceno ustreznih preskusnih koncentracij; ponovitve niso zahtevane. Med predhodnim preskusom je treba opazovati in beležiti vedenje črvov, na primer izogibanje usedlini, ki bi ga lahko povzročila preskusna kemikalija in/ali usedlina. V predhodnem preskusu ne smejo biti preskušene koncentracije, višje od 1 000 mg/kg suhe teže usedline.

Dokončni preskus

32. V dokončnem preskusu mora biti uporabljenih in izbranih vsaj pet koncentracij, npr. na podlagi rezultata predhodnega preskusa za določanje območja delovanja (odstavek 31), in kot je opisano v odstavkih 35, 36, 37 in 38.

▼M6

33. Poleg preskusne serije je treba izvesti še kontrolo (za ponovitve glej odstavke 36, 37 in 38), ki vsebuje vse sestavine, razen preskusne kemikalije. Če se za uporabo preskusne kemikalije uporablja kakršno koli sredstvo za raztapljanje, to ne sme imeti pomembnega vpliva na preskusne organizme, kar pokaže dodatna kontrola, v kateri je samo topilo.

Načrt preskusa

34. Načrt preskusa se nanaša na izbiro števila preskusnih koncentracij in razmikov med njimi, število posod za vsako koncentracijo in število dodanih črvov na posodo. Načrti za oceno vrednosti EC_x in NOEC ter izvedbo mejnega preskusa so opisani v odstavkih 35, 36, 37 in 38.

35. S koncentracijami, vključenimi v preskus, bi morala biti zajeta koncentracija z učinkom (npr. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) in razpon koncentracije, v katerem je zanimiv vpliv preskusne snovi. Izogibati se je treba ekstrapolaciji veliko pod najnižjo koncentracijo, ki vpliva na preskusne organizme, ali veliko nad najvišjo preskušano koncentracijo. Če je – v izjemnih primerih – takšna ekstrapolacija izvedena, mora biti v poročilu to podrobno pojasnjeno.

36. Če je treba oceniti vrednost EC_x, je treba preskusiti vsaj pet koncentracij in najmanj tri ponovitve za vsako koncentracijo; za kontrolo ali kontrolo s topilom, če se uporablja, se za izboljšanje ocene variabilnosti kontrole priporoča šest ponovitev. Vsekakor je priporočljivo uporabiti dovolj preskusnih koncentracij, da se omogoči dobra ocena modela. Faktor med koncentracijami ne sme biti večji od dve (izjema je dopustna, kadar je naklon krivulje koncentracija-odziv majhen). Število ponovitev na posamezno tretirano skupino se lahko zmanjša, če se poveča število preskusnih koncentracij v razponu 5–95 %. Povečanje števila ponovitev ali zmanjšanje velikosti razmikov med preskusnimi koncentracijami običajno vodi do ožjih intervalov zaupanja za preskus.

37. Če je treba oceniti vrednosti LOEC/NOEC, je treba uporabiti vsaj pet preskusnih koncentracij z vsaj štirimi ponovitvami (za kontrolo ali kontrolo s topilom, če se uporablja, se za izboljšanje ocene variabilnosti kontrole priporoča šest ponovitev), faktor med koncentracijami pa ne sme biti večji od dve. Nekatere informacije o statistični moči, ugotovljene med preskušanjem domnev v krožnem preskusu preskusne metode so podane v Dodatku 6.

38. Lahko se opravi mejni preskus (z uporabo ene preskusne koncentracije in kontrol), če do 1 000 mg/kg suhe teže usedline ni pričakovati nobenih učinkov (npr. iz preskusa določanja območja delovanja) ali če bo preskušanje ene same koncentracije dovolj za potrditev zadevne vrednosti NOEC. V slednjem primeru je treba v poročilo o preskusu vključiti podrobno utemeljitev za izbiro mejne koncentracije. Namen mejnega preskusa je izvesti preskus pri dovolj visoki koncentraciji, da lahko nosilci odločanja izključijo mogoče strupene učinke preskusne kemikalije, meja pa je določena pri koncentraciji, za katero ni pričakovati, da bi se pojavila v katerem koli primeru. Priporočenih je 1 000 mg/kg (suhe teže). Običajno je potrebnih vsaj šest ponovitev za tretirane skupine in kontrole. Nekatere informacije o statistični moči, ugotovljene med preskušanjem domnev v krožnem preskusu preskusne metode, so podane v Dodatku 6.

Pogoji izpostavljenosti

Preskusni organizmi

39. Preskus se izvede z vsaj 10 črvi za vsako ponovitev, uporabljeno za določanje bioloških parametrov. To število črvov ustreza približno 50– 100 mg mokre biomase. S predpostavko, da vsebnost suhe snovi znaša 17,1 % (48), to pomeni približno 9– 17 mg suhe biomase na posodo. V metodah US EPA

▼M6

(2000 (7)) je priporočena uporaba stopnje obremenitve, ki ne presega 1: 50 (suha biomasa: skupni organski ogljik). Za formulirano usedlino, opisano v odstavku 22, to ustreza približno 43 g usedline (suhe teže) na 10 črvov pri vsebnosti skupnega organskega ogljika, ki znaša 2,0 % suhe usedline. V primerih, ko je na posodo uporabljenih več kot 10 črvov, je treba ustrezno prilagoditi količino usedline in vode nad njo.

40. Vsi črvi, uporabljeni v preskusu, morajo prihajati iz istega vira in biti v enakem fiziološkem stanju (glej Dodatek 5). Izbrati je treba črve podobnih velikosti (glej odstavek 39). Priporočeno je, da se podvzorci serije ali zaloge črvov pred preskusom stehtajo, da se tako oceni srednja teža.

41. Črvi, ki bodo uporabljeni v preskusu, se odstranijo iz kulture (za podrobnosti glej Dodatek 5). Velike (odrasle) živali, ki ne kažejo znakov nedavne fragmentacije, se prenesejo v steklene posode (npr. petrijevke), ki vsebujejo čisto vodo. Nato se sinhronizirajo, kot je opisano v Dodatku 5. Po obnavljanju, ki traja od 10 do 14 dni, se za preskus uporabijo nepoškodovani, celi črvi podobne velikosti, ki po nežnem mehanskem dražljaju dejavno plavajo ali se plazijo. Če se preskusni pogoji razlikujejo od pogojev gojenja (npr. v temperaturi, režimu osvetljenosti in vodi nad usedlino), bi morala faza aklimatizacije, ki traja npr. 24 ur pri enaki temperaturi, režimu osvetljenosti in vodi nad usedlino, kot so uporabljeni v preskusu, zadoščati za prilagoditev črvov preskusnim pogojem. Prilagojene maloščetince je treba naključno dodeliti preskusnim posodam.

Hranjenje

42. Ker se hrana usedlini doda pred (ali med) vnosom preskusne kemikalije, se črvi med preskusom ne hrani še dodatno.

Svetloba in temperatura

43. Obdobje osvetljenosti v kulturi in preskusu običajno traja 16 ur (3), (7). Jakost svetlobe mora ostati nizka (npr. 100–500 lx), da se posnema naravne pogoje na površini usedline, izmeriti pa jo je treba vsaj enkrat med obdobjem izpostavljenosti. Temperatura mora biti ves čas preskusa 20 ± 2 °C. Na določen dani datum merjenja razlika v temperaturi med preskusnimi posodami ne sme presegati ± 1 °C. Preskusne posode je treba postaviti v preskusni inkubator ali preskusno območje naključno, da se npr. kar najbolj zmanjša vpliv mesta posode na razmnoževanje.

Prepihovanje

44. Vodo nad usedlino v preskusnih posodah je treba rahlo prepihovati (npr. z 2–4 mehurčki na sekundo) prek Pasteurjeve pipete, postavljene približno 2 cm nad površino usedline, da se usedlino čim manj vznemirja. Treba je paziti, da koncentracija raztopljenega kisika ne pade pod 30 % nasičenosti zraka (ASV). Dovod zraka je treba nadzirati in po potrebi vsaj enkrat na dan ob delavnikih prilagoditi.

Meritve kakovosti vode

45. V vodi nad usedlino je treba meriti naslednje parametre kakovosti:

Temperatura:	vsaj v eni preskusni posodi vsake ravni koncentracije in eni preskusni posodi kontrol enkrat na teden ter na začetku in koncu obdobja izpostavljenosti; po možnosti se lahko dodatno, npr. v enournih časovnih razmikih, izmeri temperatura okoliškega medija (zraka ali vodne kopeli).

▼M6

Koncentracija raztopljenega kisika:	vsaj v eni preskusni posodi vsake ravni koncentracije in eni preskusni posodi kontrol enkrat na teden ter na začetku in koncu obdobja izpostavljenosti; izražena v mg/l in % ASV (nasičenosti zraka).
Dovod zraka:	treba ga je nadzirati in ga po potrebi vsaj enkrat na dan ob delavnikih prilagoditi.
Vrednost pH:	vsaj v eni preskusni posodi vsake ravni koncentracije in eni preskusni posodi kontrol enkrat na teden ter na začetku in koncu obdobja izpostavljenosti.
Skupna trdota vode:	vsaj v eni ponovitvi kontrol in eni preskusni posodi pri najvišji koncentraciji na začetku in koncu obdobja izpostavljenosti; izražena v mg/l $CaCO_3$.
Skupna vsebnost amonijaka:	vsaj v eni ponovitvi kontrol in eni preskusni posodi vsake ravni koncentracije na začetku obdobja izpostavljenosti in nato trikrat na teden; izražena v mg/l NH_4^+ ali NH_3 ali skupnega amonijaka-N.

Če je treba zaradi merjenja parametrov kakovosti vode iz posod odstraniti vzorce znatne količine vode, je za merjenje kakovosti vode priporočljivo pripraviti ločene posode, da se razmerje količine vode in usedline ne spremeni.

Biološka opazovanja

46. Med izpostavljenostjo je treba preskusne posode opazovati, da se vizualno ocenijo morebitne spremembe vedenja pri črvih (npr. izogibanje usedlini, iztrebke, vidne na površini usedline) v primerjavi s kontrolami. Opažanja je treba zabeležiti.

47. Ob koncu preskusa se vsaka ponovitev pregleda (dodatne posode, namenjene za kemijske analize, se lahko izključijo iz pregleda). Za odstranitev vseh črvov iz preskusne posode je treba uporabiti primerno metodo. Poskrbeti je treba, da so vsi odstranjeni črvi nepoškodovani. Ena možna metoda je presejanje črvov iz usedline. Uporabiti je mogoče mrežo iz nerjavnega jekla s primerno velikostjo odprtin. Večino vode nad usedlino se skrbno odlije, preostalo usedlino in vodo pa se stresa, da nastane blato, ki ga je mogoče presejati skozi sito. Z mrežo velikosti 500 μm večina delcev usedline zelo hitro preide skozi sito, vendar je treba presejanje izvesti hitro, da se črvi ne splazijo v mrežo ali skoznjo. Mreža velikosti 250 μm bo črvom preprečila, da bi se splazili vanjo ali skoznjo, vendar je treba paziti, da na mreži ostane kar najmanj delcev usedline. Presejano blato vsake ponovitvene posode je mogoče drugič presejati, da se zagotovo odstranijo vsi črvi. Alternativna metoda je lahko ogrevanje usedline s postavitvijo preskusnih posod v vodno kopel s temperaturo 50–60 °C; črvi zapustijo usedlino in jih je mogoče z njene površine zbrati z vroče polirano široko pipeto. Druga alternativna metoda je lahko pridobivanje blata usedline in zlivanje tega blata v plitvo ponev primerne velikosti. Iz plitve plasti blata je mogoče črve pobrati z jekleno iglo ali urarsko pinceto (ki se po možnosti uporablja kot vilice in ne kot klešče, da se črvi ne poškodujejo) in jih prenesti v čisto vodo. Po ločitvi črvov iz blata usedline se črvi operejo v preskusnem mediju in preštejejo.

48. Neodvisno od uporabljene metode morajo laboratoriji dokazati, da je njihovo osebje iz celotne usedline sposobno odstraniti vsaj 90 % organizmov.

▼M6

Določeno število preskusnih organizmov je, na primer, mogoče dodati kontrolni usedlini ali preskusnim usedlinam, stopnjo odstranitve pa je mogoče določiti po eni uri (7).

49. Zabeležiti in oceniti je treba skupno število živih in mrtvih osebkov na ponovitev. Za mrtve veljajo naslednje skupine črvov:

(a) po nežnem mehanskem dražljaju ni nobene reakcije;

(b) prisotni so znaki razkrajanja (v kombinaciji s točko „a“);

(c) pogrešani črvi.

Poleg tega je mogoče žive črve dodeliti eni od treh skupin:

(a) veliki celi črvi (odrasli osebki) brez obnovljenih predelov telesa;

(b) celi črvi z obnovljenimi predeli telesa svetlejše barve (tj. z novim zadnjim delom, z novim sprednjim delom ali z novima zadnjim in sprednjim delom);

(c) neceli črvi (tj. nedavno fragmentirani črvi z neobnovljenimi predeli telesa).

Ta dodatna opažanja niso nujna, mogoče pa jih je uporabiti za dodatno razlago bioloških rezultatov (veliko število črvov, dodeljenih skupini c, lahko, na primer, kaže na zamudo pri razmnoževanju ali obnavljanju v danem tretiranju). Poleg tega je treba zabeležiti tudi morebitne opažene razlike v videzu tretiranih in kontrolnih črvov (npr. lezije povrhnjice, zabuhli deli telesa).

50. Takoj po štetju/oceni se živi črvi, najdeni v vsaki ponovitvi, prenesejo v posušene, predhodno stehtane in označene skodelice tehtnice (eno na ponovitev) ter ubijejo s kapljico etanola na skodelico tehtnice. Skodelice tehtnice se nato postavijo v sušilnik pri 100 ± 5 °C, da se čez noč posušijo, potem pa se po ohlajanju v eksikatorju stehtajo in določi se suha teža črvov (po možnosti v gramih in vsaj na 4 decimalke natančno).

51. Poleg skupne suhe teže je mogoče določiti suho težo brez pepela, kot je opisano v točki (49), da se upoštevajo anorganske sestavine, ki izvirajo iz zaužite usedline, prisotne v prebavnem traktu črvov.

52. Biomasa je določena kot skupna biomasa na ponovitev, vključno z odraslimi in mladimi črvi. Pri določanju biomase na ponovitev mrtvi črvi ne smejo biti upoštevani.

Preverjanje koncentracij preskusne kemikalije

Vzorčenje

53. Vzorci za kemijsko analizo preskusne kemikalije morajo biti odvzeti vsaj za najvišjo koncentracijo in eno nižjo, vsaj na koncu faze uravnoteženja (pred dodajanjem preskusnih organizmov) in na koncu preskusa. Za analizo morata biti vzorčeni vsaj glavnina usedline in voda nad usedlino. Vsak dan vzorčenja je treba vzeti vsaj dva vzorca na matriks in tretiranje. Enega od dveh vzorcev je mogoče shraniti kot rezervo (ki bo analizirana, če bo npr. začetna analiza zunaj razpona ± 20 % nominalne koncentracije). Pri specifičnih kemijskih lastnostih, npr. če je pričakovana hitra razgradnja

▼M6

preskusne kemikalije, se lahko časovni razpored analize na podlagi strokovnega mnenja natančneje določi (npr. s pogostejšim vzorčenjem, analizo več ravni koncentracij). Nato se vzorci lahko vzamejo na vmesne dni vzorčenja (npr. sedmi dan po začetku izpostavljenosti).

54. Vodo nad usedlino je treba zaradi čim manjšega vznemirjanja usedline vzorčiti tako, da se previdno odlije ali izčrpa. Zabeležiti je treba količino vzorcev.

55. Po tem, ko je voda nad usedlino odstranjena, se mora usedlina homogenizirati in prenesti v primerno posodo. Zabeleži se teža mokrega vzorca usedline.

56. Če je dodatno potrebna analiza preskusne kemikalije v porni vodi, je treba homogenizirane in stehtane vzorce centrifugirati, da se pridobi porna voda. Približno 200 ml mokre usedline je, na primer, mogoče natočiti v 250-mililitrske centrifugirne čaše. Nato je treba vzorce centrifugirati brez filtracije, da se loči porna voda, npr. pri 10 000 ± 600 × *g* 30–60 minut pri temperaturi, ki ne presega v preskusu uporabljene temperature. Po centrifugiranju se supernatant odlije ali nakapa s pipeto, pri čemer je treba paziti, da se prepreči vnos delcev, količina pa se zabeleži. Zabeleži se teža peleta preostale usedline. Če je vsak dan vzorčenja določena suha teža usedline, je ocena masne bilance ali obnove preskusne kemikalije v sistemu vode in usedline lažja. V nekaterih primerih koncentracij v porni vodi zaradi premajhnega vzorca morda ne bo mogoče analizirati.

57. Če analiza ni takojšnja, je treba vse vzorce shraniti na ustrezen način, npr. pri pogojih shranjevanja, ki so priporočeni za čim manjšo razgradnjo določene preskusne kemikalije (okoljski vzorci se npr. običajno shranjujejo pri – 18 °C v temi). Informacije o pravilnih pogojih shranjevanja za določeno preskusno kemikalijo, na primer trajanju in temperaturi shranjevanja, postopkih ekstrakcije itd., pridobite pred začetkom študije.

Analitska metoda

58. Ker so za celoten postopek pomembne točnost, natančnost in občutljivost analitske metode, uporabljene za preskusno kemikalijo, se je treba praktično prepričati, da so natančnost in reproduktivnost kemične analize ter ponovna pridobitev preskusne kemikalije iz vzorcev vode in usedline zadovoljive za določeno metodo vsaj pri najnižjih in najvišjih preskusnih koncentracijah. Prepričajte se tudi, da v kontrolnih komorah ni zaznati preskusne kemikalije v koncentracijah, višjih od meje določljivosti. Po potrebi popravite nominalne koncentracije za ponovno pridobivanje primešane preskusne kemikalije za nadzor kakovosti (npr. kjer je stopnja ponovnega pridobivanja zunaj območja 80– 120 % količine, v kateri je bila primešana preskusna kemikalija). V celotnem preskusu je treba z vsemi vzorci ravnati tako, da se kontaminacija in izguba čim bolj zmanjšata (npr. zaradi adsorpcije preskusne kemikalije na napravo za vzorčenje).

59. Zabeležiti je treba stopnjo ponovnega pridobivanja preskusne kemikalije, mejo zaznavnosti in mejo zaznavnosti v usedlini in vodi ter o njih poročati.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

60. Glavni obvezni spremenljivki odziva, ki jih je treba v preskusu statistično oceniti, sta biomasa in skupno število črvov na ponovitev. Neobvezno se lahko oceni tudi razmnoževanje (v obliki povečanja števila črvov) in rast (v obliki povečanja suhe biomase). V tem primeru je treba na začetku izpostavljenosti pridobiti oceno suhe teže črvov, npr. z merjenjem suhe teže reprezentativnega podvzorca serije sinhroniziranih črvov, ki bodo uporabljeni v preskusu.

▼M6

61. Čeprav smrtnost ni končna točka tega preskusa, je treba smrtnosti oceniti v čim večji meri. Za oceno smrtnosti morajo črvi, ki ne reagirajo na nežen mehanski dražljaj, ali črvi, ki kažejo znake razkrajanja ter pogrešani črvi veljati za mrtve. Smrtnosti je pri razlagi rezultatov treba vsaj zabeležiti in upoštevati.

62. Učinkovite koncentracije morajo biti izražene v mg/kg suhe teže usedline. Če je rekuperacija preskusne kemikalije, merjene v usedlini ali v usedlini in vodi nad njo ob začetku izpostavljenosti med 80 in 120 % nominalnih koncentracij, je mogoče učinkovite koncentracije (EC_x, NOEC, LOEC) izraziti na podlagi nominalnih koncentracij. Če ponovno pridobivanje odstopa od nominalnih koncentracij za več kot ± 20 % vrednosti nominalnih koncentracij, morajo učinkovite koncentracije (EC_x, NOEC, LOEC) temeljiti na prvotno izmerjenih koncentracijah na začetku izpostavljenosti, npr. upoštevati morajo masno bilanco preskusne kemikalije v preskusnem sistemu (glej odstavek 30). V teh primerih je mogoče dodatne informacije za potrditev, da so bile preskusne usedline pravilno pripravljene, pridobiti iz analize založnih raztopin in/ali uporabljenih raztopin.

EC_x

63. Vrednosti EC_x za parametre, opisane v odstavku 60, se izračunajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. z analizo probit, logistično ali Weibullovo funkcijo, prilagojeno metodo Spearman-Karber ali enostavno interpolacijo). Navodila za statistično ocenjevanje so navedena v (15) in (50). Vrednost EC_x je pridobljena tako, da je v navedeno enačbo vstavljena vrednost, ki ustreza x % srednje vrednosti kontrole. Za izračun vrednosti EC_{50} ali katere koli druge vrednosti EC_x je treba srednjo vrednost glede na tretirano skupino ($\overline{X}$) analizirati z regresijsko analizo.

NOEC/LOEC

64. Če je statistična analiza namenjena določanju vrednosti NOEC/LOEC, je potrebna statistika glede na posodo (posamezne posode se štejejo za ponovitve). Uporabljene morajo biti ustrezne statistične metode. V splošnem se s pomočjo enostransko zastavljenega (manj obsežnega) preskušanja domnev pri $p \leq 0,05$ proučijo škodljivi učinki preskusne snovi v primerjavi s kontrolo. Primeri so podani v naslednjih odstavkih. Navodila za izbiro ustreznih statističnih metod so navedena v (15) in (50).

65. Normalno porazdelitev podatkov je mogoče preskusiti npr. s preskusom ustreznosti prileganja Kolmogorov-Smirnov, preskusom razmerja med variacijskim razmikom in standardnim odklonom (preskusom R/s) ali Shapiro-Wilkovim preskusom (dvostranskim, $p \leq 0,05$). Za preskus homogenosti variance se lahko uporabi Cochranov, Levenov ali Bartlettov preskus (dvostranski, $p \leq 0,05$). Če so izpolnjeni predpogoji postopkov parametričnega preskusa (normalnosti, homogenosti variance), je mogoče izvesti enofaktorsko analizo variance (enofaktorsko ANOVA) in nato preskuse večkratne primerjave. Za izračun, ali obstajajo značilne razlike ($p \leq 0,05$) med kontrolami in različnimi koncentracijami preskusnih snovi, je mogoče uporabiti parne primerjave (npr. Dunnettov t-preskus) ali regresivne trendnostne preskuse (npr. Williamsov preskus). V nasprotnem primeru je treba za določanje vrednosti NOEC in LOEC uporabiti neparametrične metode (npr. Bonferronijev U-preskus v skladu s trendnostnim preskusom po Holmu ali Jonckheere-Terpstraju).

Mejni preskus

66. Če je izveden mejni preskus (primerjava kontrole in samo ene tretirane skupine) in če so izpolnjeni predpogoji postopkov parametričnega preskusa (normalnost, homogenost), je mogoče s Studentovim preskusom (t-preskusom) preveriti odzive metrik (skupnega števila črvov in biomase v obliki suhe teže črvov). Če te zahteve niso izpolnjene, je mogoče uporabiti t-preskus za neenake variance (Welchev t-preskus) ali neparametrični preskus, kot je Mann-Whitneyjev U-preskus. Nekatere informacije o statistični moči, ugotovljene med preskušanjem domnev v krožnem preskusu metode, so podane v Dodatku 6.

▼M6

67. Za določanje značilnih razlik med kontrolami (kontrolo in kontrolo s topilom) je mogoče ponovitve vsake kontrole preskusiti, kot je opisano za mejni preskus. Če ti preskusi ne zaznajo značilnih razlik, je mogoče vse ponovitve kontrol in kontrol s topilom združiti. V nasprotnem primeru je treba vse tretirane vzorce primerjati s kontrolo s topilom.

Razlaga rezultatov

68. Če je prišlo do odstopanja od te preskusne metode in kadar se izmerjene koncentracije preskusnih koncentracij pojavljajo na ravneh blizu meje zaznavnosti analitične metode, je treba rezultate razlagati previdno. Morebitna odstopanja od te preskusne metode je treba zabeležiti.

Poročilo o preskusu

69. Poročilo o preskusu naj vsebuje vsaj naslednje informacije:

— *Preskusna kemikalija:*

— kemijski identifikacijski podatki (splošno ime, kemijsko ime, strukturna formula, številka CAS itd.), vključno s čistostjo in analitsko metodo za kvantifikacijo preskusne snovi, virom preskusne kemikalije ter identiteto in koncentracijo vseh uporabljenih topil,

— vse informacije o fizikalnem stanju in fizikalno-kemijskih lastnostih, kot so bile pridobljene pred začetkom preskusa (npr. topnost v vodi, parni tlak, porazdelitveni koeficient v tleh (ali usedlini, če je na voljo), log K_{ow}, stabilnost v vodi itd.).

— *Preskusne vrste:*

— znanstveno ime, sev, vir, morebitna predhodna obdelava, aklimatizacija, pogoji gojenja itd.

— *Preskusni pogoji:*

— uporabljeni preskusni postopek (npr. statični, polstatični ali pretočni),

— načrt preskusa (npr. število, material in velikost preskusnih komor, količina vode na posodo (za pretočne ali polstatične postopke: hitrost nadomeščanja količine vode), morebitno prezračevanje, uporabljeno pred preskusom in med njim, število ponovitev, število črvov na ponovitev ob začetku izpostavljenosti, število preskusnih koncentracij, trajanje kondicioniranja, obdobje za uravnoteženje, obdobje izpostavljenosti, pogostost vzorčenja),

— globina usedline in vode nad njo,

— metoda predhodne obdelave preskusne kemikalije in njeno primešanje/nanos,

— nominalne preskusne koncentracije, podrobnosti o vzorčenju za kemijsko analizo in analitske metode, s katerimi so bile pridobljene koncentracije preskusne kemikalije,

— lastnosti usedline, kot je opisano v odstavkih 24 in 25, in vse druge izvedene meritve, priprava formulirane usedline,

— priprava preskusne vode (če se uporablja rekonstituirana voda) in lastnosti (koncentracija kisika, vrednost pH, prevodnost, trdota in vse druge izvedene meritve) pred začetkom preskusa,

— podrobne informacije o hranjenju, vključno z vrsto hrane, pripravo, količino in načinom hranjenja,

▼**M6**

— jakost svetlobe in obdobja osvetljenosti,

— metode, uporabljene za določanje vseh bioloških parametrov (npr. vzorčenja, pregledovanja, tehtanja preskusnih organizmov) in vseh abiotskih parametrov (npr. parametrov kakovosti vode in usedline),

— količine in/ali teže vseh vzorcev za kemijsko analizo,

— podrobne informacije o obdelavi vseh vzorcev za kemijsko analizo, vključno s podrobnostmi o pripravi, shranjevanju, postopkih primešanja preskusne kemikalije, ekstrakciji ter analitskih postopkih (in natančnosti) za preskusno kemikalijo in ponovno pridobivanje preskusne kemikalije.

— *Rezultati:*

— kakovost vode v preskusnih posodah (vrednost pH, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, trdota, koncentracije amonijaka in vse druge izvedene meritve),

— skupna vsebnost organskega ogljika (TOC), razmerje med suho in mokro težo, vrednost pH usedline in vse druge izvedene meritve,

— skupno število ter, če je določeno, število celih in necelih črvov v vsaki preskusni komori ob koncu preskusa,

— suha teža črvov v vsaki preskusni komori ob koncu preskusa in, če je izmerjena, suha teža podvzorca črvov na začetku preskusa,

— morebitno opaženo nenormalno vedenje v primerjavi s kontrolami (npr. izogibanje usedlini, prisotnost ali odsotnost iztrebkov),

— morebitne opažene smrtnosti,

— ocene strupenih končnih točk (npr. EC_x, NOEC in/ali LOEC) in statistične metode, uporabljene za njihovo določitev,

— nominalne preskusne koncentracije, izmerjene preskusne koncentracije in rezultati vseh izvedenih analiz za določitev koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah,

— morebitna odstopanja od meril za veljavnost.

— *Vrednotenje rezultatov:*

— skladnost rezultatov z merili veljavnosti, navedenimi v odstavku 13,

— obravnava rezultatov, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izvirajo iz odstopanj od te preskusne metode.

LITERATURA

(1) ES (2003). Tehnični usmeritveni dokument v podporo Direktivi Komisije 93/67/EGS o ocenjevanju tveganj v zvezi z novimi prijavljenimi snovmi, Uredbi Komisije (ES) št. 1488/94 o ocenjevanju tveganja, ki ga predstavljajo obstoječe snovi, in Direktivi 98/8/ES Evropskega parlamenta in Sveta o dajanju biocidnih pripravkov v promet; del I–IV. Urad za publikacije Evropske unije (Evropska komisija), Luksemburg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs, št 60. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), Pariz.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. V: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Zvezek 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. V: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Zvezek 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., in Mattson, V. R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(6) Poglavje C.27 te priloge: Preskus strupenosti s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo usedline s primešano preskusno snovjo.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Druga izdaja. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I. R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (ur.) 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8. – 10. november 1993, Renesse (Nizozemska).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Uredila M. Streloke in H. Köpp. Berlin, 1995.

(11) Riedhammer, C., in Schwarz-Schulz, B. (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105– 110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., in Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. V sodelovanju z R. Nagelom in B. Karaoglanom. Poročilo nemški Zvezni agenciji za okolje (Umweltbundesamt Berlin), R&D, št.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; peti osnutek, marec 2003; Report EPS 1/RM/___.

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J. V. K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35–46.

(17) Baily, H. C., in Liu, D. H. W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. str. 205–215. V: Eaton, J. C., Parrish, P. R., in Hendricks, A. C. (ur.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O., in Scheuerman, P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271–278.

(19) Meyer, J. S., Boese, C. J., in Collyard, S. A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Del C 133:99– 109.

(20) Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D., in Ankley, G. T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261– 1266.

(21) West, C. W., Mattson, V. R., Leonard, E. N., Phipps, G. L., in Ankley, G. T. (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57–63.

(22) Ingersoll, C. G., Ankley, G. T., Benoit D. A., Brunson, E. L., Burton, G. A., Dwyer, F. J., Hoke, R. A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J., in Winger, P. V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J., in Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457– 1468.

(24) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202.

(25) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183– 194.

(26) Landrum, P. F., Gedeon, M. L., Burton, G. A., Greenberg. M. S., in Rowland, C. D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292–302.

(27) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J., in Kemble, N. E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201.

(28) Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Wang, N., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Mount, D. R., Huckins J., Petty., J., in Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885.

(29) Rodriguez, P., in Reynoldson, T. B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. V: Mudroch, A., Azcue, J. M. in Mudroch, P. (ur.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph., Oehlmann, J., in Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271–280.

(31) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D., in Nagel, R. (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, str. 2000–2007.

(32) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U., in Nagel, R. (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Po naročilu nemške Zvezne agencije za okolje (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marec, 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503– 1508.

(34) Dermott, R., in Munawar, M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407–414.

(35) Drewes, C. D., in Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94– 103.

(36) Brinkhurst, R. O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. št. 22.

(37) Poglavje C.1 te priloge, Akutna strupenost za ribe (preskus).

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals, št. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariz.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G., in Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835–852.

(40) Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., in Streit, B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10–20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., in Studinger, G. (1999). Delavnica na temo „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.–27. 4. 1999, Hochheim/Main, Nemčija. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B. C., in Rodgers, J. H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163– 1175.

(43) Naylor, C., in Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(44) Kaster, J. L., Klump, J. V., Meyer, J., Krezoski, J., in Smith, M. E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181– 184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J. I., in Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111– 124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588–595.

(48) Brooke, L. T., Ankley, G. T., Call, D. J., in Cook, P. M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223–228.

(49) Mount, D. R., Dawson, T. D., in Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244–1249.

▼M6

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD, Pariz, Francija.

(51) Liebig, M., Meller, M., in Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24.–25. marec 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Nemčija, str. 107–119.

Dodatna literatura o statističnih postopkih:

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096– 1121.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482–491.

Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3. izdaja), str. 19–76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M. A., Russo, R. C., in Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

Sokal, R. R., in Rohlf, F. J. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2. izdaja. W. H. Freeman and Company. New York.

Miller, R. G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro, S. S., in Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591–611.

Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519–531.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve:

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

Obdobje kondicioniranja se uporablja za stabiliziranje mikrobne komponente usedline in odstranjevanje npr. amonijaka, ki izvira iz komponent usedline; gre za obdobje pred primešanjem preskusne kemikalije usedlini. Običajno se voda nad usedlino po kondicioniranju zavrže.

Vrednost EC_x je koncentracija preskusne kemikalije v usedlini, ki v navedenem obdobju izpostavljenosti povzroči X-odstotni (npr. 50-odstotni) učinek na biološki parameter.

Obdobje za uravnoteženje se uporablja za porazdelitev preskusne kemikalije med trdno fazo, porno vodo in vodo nad usedlino; gre za obdobje po primešanju preskusne kemikalije usedlini in pred dodajanjem preskusnih organizmov.

Faza izpostavljenosti je čas, v katerem so preskusni organizmi izpostavljeni preskusni kemikaliji.

Formulirana usedlina ali rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina je zmes snovi, uporabljenih za posnemanje fizičnih sestavin naravne usedline.

Najnižja koncentracija z opaznim učinkom (LOEC) je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je bilo opaženo, da ima snov značilen strupen učinek (pri $p \leq 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar morajo imeti vse koncentracije nad vrednostjo LOEC učinek, ki je enak ali večji od učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni možno izpolniti, je treba podrobno razložiti, kako je bila izbrana vrednost LOEC (in s tem tudi vrednost NOEC).

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskusna koncentracija tik pod vrednostjo LOEC, ki v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p \leq 0,05$).

Porazdelitveni koeficient oktanol/voda (K_{ow}, včasih izražen tudi kot P_{ow}) je uravnoteženo razmerje topnosti kemikalije v n-oktanolu in vodi ter predstavlja lipofilnost kemikalije (poglavje A.24 te priloge). Vrednost K_{ow} ali logaritem K_{ow} ($\log K_{ow}$) se uporablja kot pokazatelj potenciala kemikalije za bioakumulacijo v vodnih organizmih.

Porazdelitveni koeficient organski ogljik/voda (K_{oc}) je razmerje med koncentracijo kemikalije v/na delu usedline z organskim ogljikom in koncentracijo kemikalije v vodi v ravnotežnem stanju.

Voda nad usedlino je voda, ki prekriva usedlino v preskusni posodi.

Porna voda ali intersticijska voda je voda, ki zavzema prostor med delci usedline ali tal.

Usedlina s primešano kemikalijo je usedlina, ki ji je bila dodana kemikalija.

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼**M6**

Dodatek 2

Sestava priporočene rekonstituirane vode

(prevzeto iz poglavja C.1 te priloge (1))

(a) *Raztopina kalcijevega klorida*

Raztopite 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ v deionizirani vodi: z deionizirano vodo dopolnite do 1 l.

(b) *Raztopina magnezijevega sulfata*

Raztopite 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ v deionizirani vodi: z deionizirano vodo dopolnite do 1 l.

(c) *Raztopina natrijevega bikarbonata*

Raztopite 2,59 g $NaHCO_3$ v deionizirani vodi: z deionizirano vodo dopolnite do 1 l.

(d) *Raztopina kalijevega klorida*

Raztopite 0,23 g KCl v deionizirani vodi: z deionizirano vodo dopolnite do 1 l.

Vse kemikalije morajo biti analitsko čiste.

Prevodnost destilirane ali deionizirane vode ne sme presegati 10 μScm^{-1}.

25 ml vsake od raztopin v točkah od (a) do (d) je zmešanih z deionizirano vodo, skupna količina pa je s to vodo dopolnjena do 1 l. Vsota kalcijevih in magnezijevih ionov v teh raztopinah je 2,5 mmol/l.

Razmerje ionov Ca in Mg je 4: 1, ionov Na in K pa 10: 1. Alkalnost $K_{S4.3}$ te raztopine znaša 0,8 mmol/l.

Vodo za redčenje prepihujte, dokler ni dosežena nasičenost s kisikom, nato pa jo pred uporabo shranite za približno dva dni in je ne prepihujte več.

VIR

(1) Poglavje C.1 te priloge, Akutna strupenost za ribe (preskus).

▼**M6**

Dodatek 3

Fizikalno-kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje

Sestavina	Koncentracije
delci	< 20 mg/l
celotni organski ogljik	< 2 µg/l
neionizirani amonijak	< 1 µg/l
ostanek klora	< 10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l
(prevzeto iz OECD (1992) (1))	

VIR

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals, št. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariz.

▼M6

Dodatek 4

Priporočljiva umetna usedlina – navodila za pripravo in shranjevanje

Sestavine usedline

Sestavina	Lastnosti	% suhe teže usedline
šota	šotni mah, stopnja razpada: „srednja“,sušen na zraku, brez vidnih ostankov rastlin, fino mlet (velikost delcev ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
kremenov pesek	velikost zrn: > 2 mm, vendar mora > 50 % delcev meriti med 50 in 200 μm	75–76
kaolinska glina	vsebnost kaolinita ≥ 30 %	20 ± 1
vir hrane	npr. prah vrste Urtica (listov koprive), listi vrste Urtica dioica (velike koprive), fino mleti (velikost delcev ≤ 0,5 mm); v skladu s farmacevtskimi standardi, za prehrano ljudi; poleg suhe usedline	0,4–0,5 %
organski ogljik	uravnava se z dodatkom šote in peska	2 ± 0,5
kalcijev karbonat	$CaCO_3$, zdrobljen v prah, kemijsko čist, poleg suhe usedline	0,05–1
deionizirana voda	prevodnost ≤ 10 μS/cm, poleg suhe usedline	30–50

Opomba: Če so pričakovane povišane koncentracije amonijaka, npr. če je znano, da preskusna kemikalija zavira nitrifikacijo, je lahko koristna zamenjava 50 % koprivnega prahu, bogatega z dušikom, s celulozo (npr. s kemijsko čistim prahom α-celuloze velikosti delcev ≤ 0,5 mm; (1)(2)).

Priprava

Šota se posuši na zraku in zmelje v fin prah. Pripravi se suspenzija potrebne količine šote v prahu v deionizirani vodi, za kar se uporabi visoko zmogljiva naprava za homogenizacijo. Vrednost pH te suspenzije se s $CaCO_3$ uravna na 5,5 ± 0,5. Suspenzija se vsaj dva dneva kondicionira z rahlim mešanjem pri 20 ± 2 °C, da se stabilizira vrednost pH in vzpostavi stabilna mikrobna komponenta. Vrednost pH se znova izmeri in mora biti 6,0 ± 0,5. Šotna suspenzija se nato zmeša z drugimi sestavinami (peskom in kaolinsko glino) in deionizirano vodo, da nastane homogena usedlina z vsebnostjo vode v razponu 30–50 % suhe teže usedline. Vrednost pH končne mešanice se znova izmeri in se po potrebi s $CaCO_3$ uravna na od 6,5 do 7,5. Če pa je pričakovan razvoj amonijaka, je lahko vrednost pH usedline koristno ohranjati pod 7,0 (npr. med 6,0 in 6,5). Vzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in vsebnost organskega ogljika. Če je pričakovan razvoj amonijaka, se formulirana usedlina lahko kondicionira sedem dni pri enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu (razmerje usedline in vode je npr. 1: 4, višina plasti usedline pa enaka tisti v preskusnih posodah), preden ji je primešana preskusna kemikalija, tj. dotočiti je

▼M6

treba vodo, ki jo je treba prepihovati. Ob koncu obdobja kondicioniranja je treba vodo nad usedlino odstraniti in zavreči. Nato se kremenov pesek, ki mu je primešana preskusna kemikalija, za vsako raven tretiranja zmeša z usedlino, usedlino pa se porazdeli med ponovitvene preskusne posode in se ji dotoči preskusno vodo. Nato se posode inkubirajo pri enakih pogojih, kakršni vladajo v poznejšem preskusu. To je začetek obdobja za uravnoteženje. Vodo nad usedlino je treba prepihovati.

Izbrani vir hrane mora biti dodan pred primešanjem preskusne kemikalije usedlini ali med njim. Lahko se najprej zmeša s šotno suspenzijo (glej zgoraj). Vendar se je obsežni razgradnji vira hrane pred dodajanjem preskusnih organizmov – npr. v primeru dolgega obdobja za uravnoteženje – mogoče izogniti s čim krajšim časom med dodajanjem hrane in začetkom izpostavljenosti. Za zagotovitev, da je hrani primešana preskusna kemikalija, je treba vir hrane zmešati z usedlino najkasneje isti dan, ko se preskusna kemikalija primeša usedlini.

Shranjevanje

Suhe sestavine umetne usedline se lahko shranjujejo v suhem in hladnem prostoru pri sobni temperaturi. Pripravljeno usedlino, ki ji je primešana preskusna kemikalija, je treba v preskusu uporabiti takoj. Vzorci usedline s primešano preskusno kemikalijo se lahko nato do analize hranijo v pogojih, priporočenih za zadevno preskusno kemikalijo.

VIRA

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., in Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. V sodelovanju z R. Nagelom in B. Karaoglanom. Poročilo nemški Zvezni agenciji za okolje (Umweltbundesamt Berlin), R&D, št.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M., in Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24.–25. marec 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Nemčija, str. 107–119.

▼M6

Dodatek 5

Metode gojenja vrste *Lumbriculus variegatus*

Vrsta *Lumbriculus variegatus* (Müller) iz družine Lumbriculidae in reda maloščetincev prebiva v sladkovodnih usedlinah in se pogosto uporablja v ekotoksikološkem preskušanju. V laboratorijskih pogojih jo je enostavno gojiti. Metode gojenja so opisane spodaj.

Metode gojenja

Pogoji gojenja vrste *Lumbriculus variegatus* so podrobno opisani v Phipps idr. (1993) (1), Brunson idr. (1998) (2), ASTM (2000) (3) in U.S. EPA (2000) (4). Kratek povzetek teh pogojev je opisan spodaj. Glavna prednost vrste *L. variegatus* je njeno hitro razmnoževanje, zaradi česar se v laboratorijsko gojenih populacijah izjemno hitro povečuje biomasa (npr. (1), (3), (4), (5)).

Črve je mogoče gojiti v velikih akvarijih (57–80 l) pri 23 °C z obdobjem osvetljenosti 16 ur svetlobe in 8 ur teme (100–1 000 lx) in z uporabo dnevno osveževane naravne vode (45–50 l na akvarij). Substrat se pripravi tako, da se nebeljene rjave papirnate brisače razrežejo na trakove, ki jih je nato mogoče za nekaj sekund zmešati z vodo za gojenje, zaradi česar nastanejo majhni deli papirnatega substrata. Ta substrat je nato mogoče takoj uporabiti v akvariju za gojenje vrste *Lumbriculus*; z njim se prekrije dno posode, lahko pa se tudi zamrzne v deionizirani vodi in tak shrani za kasnejšo uporabo. Svež substrat v posodi bo običajno zdržal približno dva meseca.

Vsaka kultura črvov se začne z od 500 do 1 000 črvi, hranjenimi z 10-mililitrsko suspenzijo, ki pri pogojih obnavljanja vode ali pretočnih pogojih vsebuje 6 g začetne hrane za gojenje trikrat na teden. Hranjenje statičnih in polstatičnih kultur mora biti manj pogosto, da se prepreči rast bakterij ali gliv.

V teh pogojih se število posameznih osebkov v kulturi običajno podvoji v obdobju približno od 10 do 14dni.

Namesto tega je vrsto *Lumbriculus variegatus* mogoče gojiti tudi v sistemu, ki ga sestavljata plast kremenovega peska, kakršen se uporablja za umetno usedlino (globine 1–2 cm), in rekonstituirana voda. Kot posode za gojenje se lahko uporabijo steklene posode ali posode iz nerjavnega jekla višine od 12 do 20 cm. Vodno telo je treba prek pasteurjeve pipete, nameščene približno 2 cm nad površino usedline, rahlo prepihovati (npr. z 2 mehurčkoma na sekundo). Za preprečevanje kopičenja npr. amonijaka je treba vodo nad usedlino zamenjati prek pretočnega sistema ali, vsaj enkrat na teden, ročno. Maloščetince je mogoče vzdrževati pri sobni temperaturi s 16 urami svetlobe (pri osvetljenosti 100–1 000 lx) in 8 urami teme. V polstatičnih kulturah (z obnavljanjem vode enkrat na teden) se črvi hranijo dvakrat na teden s hrano TetraMin (npr. 0,6–0,8 mg na cm^2 površine usedline), ki jo je mogoče vnesti kot suspenzijo 50 mg hrane TetraMin na ml deionizirane vode.

Vrsto *Lumbriculus variegatus* je mogoče iz kultur odstraniti npr. s prenosom substrata s fino mrežo ali s prenosom organizmov z vroče polirano široko pipeto (premera približno 5 mm) v ločeno čašo. Če je v to čašo hkrati prenesen tudi substrat, se čaša, ki vsebuje črve, in substrat prek noči pustita v pretočnih pogojih, ki bodo iz čaše odstranili substrat, črvi pa bodo ostali na dnu posode. Nato jih je mogoče prenesti v na novo pripravljene gojitvene rezervoarje ali pa nadalje obdelati za preskus, kot je opisano v (3) in (4) ali v nadaljevanju.

Vprašanje, ki ga je pri uporabi vrste *L. variegatus* v preskusih z usedlino treba kritično obravnavati, je njen način razmnoževanja (z arhitomijo ali morfalakso, npr. (6)). S tem nespolnim razmnoževanjem nastaneta dva fragmenta, ki se določeno obdobje ne hranita, dokler se del glave ali repa ne obnovi (npr. (7), (8)). To pomeni, da izpostavljenost prek zaužitja kontaminirane usedline pri vrsti *L. variegatus* ne poteka neprekinjeno.

▼M6

Zato je treba izvesti sinhronizacijo, da se kar najbolj zmanjša nenadzorovano razmnoževanje in regeneracija ter posledična velika variacija pri rezultatih preskusa. Do take variacije lahko pride, če so določeni osebki, ki so fragmentirali in se zato določeno obdobje ne hranijo, izpostavljeni preskusni kemikaliji manj od drugih osebkov, ki med preskusom ne fragmentirajo (9), (10), (11). Črve je treba od 10 do 14 dni pred začetkom izpostavljenosti umetno fragmentirati (sinhronizacija). Za sinhronizacijo je treba izbrati velike (odrasle) črve, ki po možnosti ne kažejo znakov nedavne morfalakse. Te črve je mogoče postaviti na objektno stekelce v kapljico vode za gojenje in jih s skalpelom razdeliti v srednjem delu telesa. Treba je paziti, da so zadnji deli podobne velikosti. Nato je treba zadnje dele pustiti, da v posodah za gojenje, ki vsebujejo enak substrat, kot je bil uporabljen v kulturi, in rekonstituirano vodo, ustvarijo nove glave. Na ustvarjanje novih glav kaže zakopavanje sinhroniziranih črvov v substrat (obnovljene glave je mogoče potrditi s pregledovanjem podvzorca pod binokularnim mikroskopom). Pričakuje se, da bodo preskusni organizmi nato v podobnem fiziološkem stanju. To ob pojavu razmnoževanja sinhroniziranih črvov z morfalakso med preskusom pomeni, da je od skoraj vseh živali pričakovati enako izpostavljenost usedlini, ki ji je primešana preskusna kemikalija. Hranjenje sinhroniziranih črvov se izvede enkrat, takoj ko se črvi začnejo zakopavati v substrat, ali 7 dni po delitvi. Režim hranjenja mora biti primerljiv z rednimi kulturami, priporočljivo pa je, da se sinhronizirani črvi hranijo z enakim virom hrane, kot bo uporabljen v preskusu. Črve je treba vzdrževati pri temperaturi preskusa 20 °C ± 2 °C. Po obnavljanju je treba za preskus uporabiti nepoškodovane, cele črve, ki po nežnem mehanskem dražljaju dejavno plavajo ali se plazijo. Poškodbe ali avtotomijo pri črvih je treba preprečevati; s črvi je treba rokovati npr. s pipetami, ki imajo vroče polirane robove, ali z iglami iz nerjavnega jekla.

Viri začetnih kultur za vrsto *Lumbriculus variegatus* (naslovi v ZDA so prevzeti iz (4))

Evropa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Nemčija

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Nemčija

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finska

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Nemčija

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

ZDA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

VIRI

(1) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., in Mattson, V. R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(2) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J., in Kemble, N. E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688–00a. V ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Vol. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Druga izdaja. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

(5) Kukkonen, J., in Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(6) Drewes C. D., in Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94–103.

(7) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202.

(8) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194.

(9) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D., in Nagel, R. (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, str. 2000–2007.

(10) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U., in Nagel, R. (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Po naročilu nemške Zvezne agencije za okolje (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, marec, 2000.

(11) Leppänen, M. T., in Kukkonen J. V. K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503–1508.

▼M6

Dodatek 6

Povzetek rezultatov krožnega preskusa

„Preskus strupenosti usedline z vrsto *Lumbriculus variegatus*“

Preglednica 1

Rezultati posameznih potekov krožnega preskusa: srednja vrednost števila črvov v kontrolah in kontrolah s topilom na koncu preskusa; SD (standard deviation) = standardni odklon; KV (coefficient of variation) = koeficient variacije.

	Srednja vrednost števila črvov v kontrolah	SD	KV (%)	n	Srednja vrednost števila črvov v kontrolah s topilom	SD	KV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
Srednja vrednost pri poskusih iz primerjave med laboratoriji	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
najmanj	**16,3**				**15,0**			
največ	**42,0**				**43,7**			
KV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Preglednica 2

Rezultati posameznih potekov krožnega preskusa: srednja vrednost skupne suhe teže črvov na ponovitev v kontrolah in kontrolah s topilom na koncu preskusa; SD (standard deviation) = standardni odklon; KV (coefficient of variation) = koeficient variacije.

	Skupna suha teža črvov na ponovitev (kontrole)	SD	KV (%)	n	Skupna suha teža črvov na ponovitev (kontrole s topilom)	SD	KV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Srednja vrednost pri poskusih iz primerjave med laboratoriji	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
najmanj	**12,9**				**10,5**			
največ	**41,3**				**41,4**			
KV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Preglednica 3

Strupenost PCP: povzetek končnih točk v krožnem preskusu; srednje vrednosti pri poskusih iz primerjave med laboratoriji za EC_{50}, NOEC in LOEC; SD (standard deviation) = standardni odklon; KV (coefficient of variation) = koeficient variacije.

Biološki parameter		Srednja vrednost pri preskusih iz primerjave med laboratoriji (mg/kg)	najmanj	največ	Faktor pri preskusih med laboratoriji	SD	KV (%)	Geometrijska sredina (mg/kg)
Skupno število črvov	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
Skupna suha teža črvov	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
Smrtnost/ preživetje	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Razmnoževanje (povečanje števila črvov na ponovitev)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
Rast (povečanje biomase na ponovitev)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD (minimum detectable difference): najmanjša zaznavna razlika v primerjavi s kontrolnimi vrednostmi med preskušanjem domnev, uporabljena kot merilo statistične moči.

VIR

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. in Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. V sodelovanju z R. Nagelom in B. Karaoglanom. Poročilo nemški Zvezni agenciji za okolje (Umweltbundesamt Berlin), R&D, št.: 202 67 429.

▼M6

C.36 PRESKUS RAZMNOŽEVANJA PLENILSKE PRŠICE (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) V TLEH

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 226 (2008). Ta preskusna metoda je zasnovana za ocenjevanje učinkov kemikalij v tleh na sposobnost razmnoževanja vrste talne pršice *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), zato omogoča oceno zaviranja hitrosti rasti določene populacije (1,2). Sposobnost razmnoževanja pri tem pomeni število mladičev na koncu obdobja preskušanja. Vrsta *H. aculeifer* predstavlja dodatno trofično raven za vrste, za katere so preskusne metode že na voljo. Za namen te preskusne metode velja, da zadošča preskus razmnoževanja brez razlikovanja in kvantifikacije različnih faz razmnoževalnega cikla. Za kemijske snovi z drugačnim scenarijem izpostavljenosti, ki ne poteka prek tal, so lahko primerni drugi pristopi (3).

2. Vrsta *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* velja za ustrezno predstavnico talne favne in še posebej plenilskih pršic. Živi po vsem svetu (5) ter jo je enostavno zbirati in gojiti v laboratoriju. Povzetek biologije vrste *H. aculeifer* je v Dodatku 7. Na voljo so osnovne informacije o ekologiji vrste pršice in njeni uporabi pri ekotoksikološkem preskušanju (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

NAČELO PRESKUSA

3. Odrasle samice se izpostavijo razponu koncentracij preskusne kemikalije, vmešane v tla. Preskus se začne z 10 odraslimi samicami na ponovitveno posodo. Samci v preskus niso vneseni, saj izkušnje kažejo, da se samice takoj po tem, ko se izležejo iz faze deutonimfe, parijo, če so prisotni samci. Poleg tega bi vključitev samcev podaljšala preskus tako, da bi bilo potrebno zahtevno razlikovanje starostnih skupin. Zato samo parjenje ni del preskusa. Samice so vnesene v preskus 28–35 dni po začetku obdobja odlaganja jajčec pri sinhronizaciji (glej Dodatek 4), saj samice takrat lahko veljajo za že parjene in so že prešle fazo pred obdobjem odlaganja jajčec. Pri temperaturi 20 °C se preskus konča 14. dan po vnosu samic (dan 0), kar omogoča, da prvi potomci v kontroli dosežejo fazo deutonimfe (glej Dodatek 4). Za glavno merjeno spremenljivko se določi število mladičev na preskusne posode in dodatno še število preživelih samic. Sposobnost razmnoževanja pršic, izpostavljenih preskusni kemikaliji, se primerja s sposobnostjo razmnoževanja v kontrolah, da se določi vrednost ECx (npr. EC10, EC50) ali pa koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1), odvisno od načrta poskusa (glej odstavek 29). Pregled časovnega načrta preskusa je podan v Dodatku 8.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

4. Po možnosti morajo biti znani topnost v vodi, vrednost log K_{ow}, porazdelitveni koeficient tla/voda in parni tlak preskusne kemikalije. Zaželene so dodatne informacije o usodi preskusne kemikalije v tleh, kot so hitrosti biotske in abiotske razgradnje.

5. To preskusno metodo je mogoče uporabiti za vodotopne in nevodotopne kemikalije. Vendar se bodo načini nanosa preskusne kemikalije ustrezno razlikovali. Preskusna metoda se ne sme uporabljati pri hlapnih kemikalijah, tj. kemikalijah, za katere je Henryjeva konstanta ali porazdelitveni koeficient zrak/voda večja od ena, ali pri kemikalijah, pri katerih parni tlak presega 0,0133 Pa pri 25 °C.

▼M6

VELJAVNOST PRESKUSA

6. Da rezultat preskusa šteje kot veljaven, morajo biti v netretiranih kontrolah izpolnjena naslednja merila:

— srednja vrednost smrtnosti odraslih samic na koncu preskusa ne sme presegati 20 %,

— srednja vrednost števila mladičev na ponovitev (z vnesenimi 10 odraslimi samicami) mora biti ob koncu preskusa vsaj 50,

— koeficient variacije, izračunan za število mladičev pršic na ponovitev ob koncu dokončnega preskusa, ne sme presegati 30 %.

REFERENČNA KEMIKALIJA

7. Za zagotovitev, da so laboratorijski preskusni pogoji ustrezni, in za potrditev, da se odziv preskusnih organizmov ni spremenil skozi čas, je treba določiti vrednosti ECx in/ali NOEC referenčne kemikalije. Dimetoat (CAS 60-51-5) je primerna referenčna kemikalija, za katero je dokazano, da vpliva na velikost populacije (4). Kot alternativna referenčna kemikalija se lahko uporabi borova kislina (CAS 10043-35-3). S to kemikalijo je pridobljenih manj izkušenj. Obstajata dve možnosti načrta:

— referenčno kemikalijo je mogoče preskusiti vzporedno z določanjem strupenosti vsake preskusne kemikalije pri eni koncentraciji, ki mora biti dokazana predhodno v študiji odziva v odvisnosti od odmerka, katere učinek mora biti > 50 % zmanjšanje števila potomcev. V tem primeru mora biti število ponovitev enako številu kontrol (glej odstavek 29),

— druga možnost je preskušanje referenčne kemikalije enkrat do dvakrat letno v preskusu odziva v odvisnosti od odmerka. Glede na izbrani načrt se število koncentracij in ponovitev ter faktor razmika razlikujejo (glej odstavek 29), vendar mora biti dosežen odziv z 10–90-odstotnim učinkom (faktor razmika 1,8). Vrednost EC_{50} za dimetoat na podlagi števila mladičev mora biti v območju med 3,0 in 7,0 mg a.s./kg tal (suhe teže). Na podlagi rezultatov, ki so bili z borovo kislino pridobljeni do zdaj, mora biti vrednost EC50 na podlagi števila mladičev v območju med 100 in 500 mg/kg suhe teže tal.

OPIS PRESKUSA

Preskusne posode in oprema

8. Uporabiti je treba preskusne posode premera 3–5 cm (višina zemlje ≥ 1,5 cm), izdelane iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala, s tesno prilegajočim se pokrovom. Prednost imajo navojni pokrovi in v tem primeru je posode mogoče prezračevati dvakrat tedensko. Druga možnost je uporaba pokrovov, ki omogočajo neposredno izmenjavo plinov med substratom in ozračjem (npr. gaze). Ker je treba med preskusom vzdrževati dovolj visoko vsebnost vlage, je v tem času nujno nadzorovati težo vsake posode za poskus in po potrebi doliti vodo. Če navojni pokrovi niso na voljo, je to lahko še posebej pomembno. Če se uporablja neprozorna posoda, mora biti pokrov iz materiala, ki omogoča dostop svetlobe (npr. s pomočjo perforiranega prozornega pokrova), pri tem pa mora pršicam preprečevati pobeg. Velikost in vrsta posode sta odvisni od metode ekstrakcije (za podrobnosti glej Dodatek 5). Če je ekstrakcija s toploto uporabljena neposredno v preskusni posodi, je na dno mogoče dodati mrežico z ustrezno velikostjo odprtin (do ekstrakcije zatesnjeno), globina tal pa mora biti zadostna, da omogoča nihanje temperature in vlage.

▼M6

9. Zahtevana je standardna laboratorijska oprema, posebej naslednje:

— po možnosti steklene posode z navojnimi pokrovi,

— sušilna omara,

— stereomikroskop,

— krtače za prenos pršic,

— merilnik vrednosti pH in merilnik osvetljenosti,

— ustrezne natančne tehtnice,

— ustrezna oprema za uravnavanje temperature,

— ustrezna oprema za uravnavanje vlažnosti zraka (ni nujna, če so posode za izpostavljanje pokrite s pokrovi),

— inkubator z uravnavanjem temperature ali majhna soba,

— oprema za ekstrakcijo (glej Dodatek 5) (13),

— viseči vir svetlobe z možnostjo uravnavanja,

— kozarci za zbiranje ekstrahiranih pršic.

Priprava umetnih tal

10. Za ta preskus se uporabljajo umetna tla. Umetna tla sestavljajo naslednje sestavine (vse vrednosti temeljijo na suhi masi):

— 5 % šotnega mahu, posušenega na zraku in fino mletega (sprejemljiva je velikost delcev 2 ± 1 mm),

— 20 % kaolinske gline (po možnosti naj bo vsebnost kaolinita nad 30 %),

— približno 74 % na zraku posušenega industrijskega peska (odvisno od potrebne količine $CaCO_3$), v glavnem finega peska z več kot 50 % delcev, ki merijo med 50 in 200 mikroni. Natančna količina peska je odvisna od količine $CaCO_3$ (glej spodaj); skupaj morata obe količini znašati do 75 %,

— < 1,0 % kalcijevega karbonata ($CaCO_3$, zdrobljenega v prah, analitsko čistega) za doseganje vrednosti pH, ki znaša 6,0 ± 0,5; količina kalcijevega karbonata, ki bo dodana, je lahko odvisna zlasti od kakovosti/značilnosti šote (glej opombo 1).

Opomba 1: potrebna količina $CaCO_3$ bo odvisna od sestavin substrata tal in jo je treba določiti z merjenjem vrednosti pH podvzorcev tal tik pred preskusom (14).*Opomba 2:* vsebnost šote v umetnih tleh odstopa od drugih preskusnih metod za organizme tal, pri katerih je v večini primerov uporabljenih 10 % šote (npr. (15)). Vendar običajna kmetijska tla glede na EPPO (16) ne vsebujejo več kot 5 % organske snovi in znižanje vsebnosti šote zato odraža zmanjšane možnosti naravnih tal za sorpcijo preskusne kemikalije na organski ogljik.*Opomba 3:* po potrebi, npr. za posebne namene preskušanja, lahko kot preskusni in/ali gojitveni substrat služijo tudi naravna tla z neonesnaženih mest. Vendar pa je treba naravnim tlom, če bodo uporabljena, določiti značilnosti vsaj glede izvora (mesta zbiranja), vrednosti

▼M6

pH, teksture (porazdelitve delcev glede na velikost) in vsebnosti organske snovi. Če sta na voljo, je treba vključiti vrsto in ime tal glede na razvrstitev tal, tla pa ne smejo biti onesnažena. Če je preskusna kemikalija kovina ali organsko-kovinska spojina, je treba določiti tudi sposobnost izmenjave kationov (CEC) naravnih tal. Posebno pozornost je treba nameniti izpolnjevanju meril za veljavnost, saj osnovnih informacij o naravnih tleh običajno ni veliko.

11. Suhe sestavine tal se temeljito premešajo (npr. v velikem laboratorijskem mešalniku). Za določanje vrednosti pH se uporablja zmes tal in raztopine 1 M kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M kalcijevega klorida ($CaCl_2$) v razmerju 1: 5 (glej (14) in Dodatek 3). Če so tla bolj kisla, kot je določeno z zahtevanim območjem (glej odstavek 10), jih je mogoče prilagoditi z dodajanjem ustrezne količine $CaCO_3$. Če so tla preveč alkalna, jih je mogoče prilagoditi z dodajanjem večje količine zmesi, sestavljene iz prvih treh sestavin, navedenih v odstavku 10, vendar brez $CaCO_3$.

12. Največja zmogljivost zadrževanja vode (water holding capacity – WHC) umetnih tal je določena v skladu s postopki, opisanimi v Dodatku 2. Od dva do sedem dni pred začetkom preskusa se suha umetna tla predhodno navlažijo z dodajanjem zadostne količine destilirane ali deionizirane vode, da je pridobljena približno polovica končne vsebnosti vode, kar je od 40 do 60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode. Vsebnost vlage se z dodajanjem raztopine preskusne kemikalije in/ali z dodajanjem destilirane ali deionizirane vode prilagodi na 40–60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode (glej odstavke 16– 18). Vsebnost vlage v tleh je treba dodatno preveriti z rahlim stiskanjem tal v roki; če je vsebnost vlage pravilna, se morajo med prsti pojaviti majhne kapljice vode.

13. Vsebnost vlage v tleh se določi ob začetku in koncu preskusa s sušenjem na konstantno težo pri 105 °C v skladu s standardom ISO 11465 (17), vrednost pH tal pa v skladu z Dodatkom 3 ali standardom ISO 10390 (14). Te meritve je treba izvesti v dodatnih vzorcih brez pršic, sestavljenih iz kontrolnih tal in tal s posamezno preskusno koncentracijo. Ob preskušanju kislih ali bazičnih kemikalij vrednosti pH tal ni dovoljeno prilagajati. Med celotnim preskusom je treba z rednim tehtanjem posod nadzorovati vsebnost vlage (glej odstavka 20 in 24).

Izbira in priprava preskusnih živali

14. Vrsta, uporabljena v preskusu, je *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Za začetek preskusa so potrebne odrasle samice, pridobljene iz sinhronizirane kohorte. Pršice je treba vnesti od 7 do 14 dni po tem, ko odrastejo, 28–35 dni po začetku odlaganja jajčec med sinhronizacijo (glej odstavek 3 in Dodatek 4). Zabeležiti je treba vir pršic ali dobavitelja in vzdrževanje laboratorijske kulture. Če je laboratorijska kultura vzdrževana, je priporočljivo potrjevanje identitete vrste vsaj enkrat na leto. Obrazec s podatki za identifikacijo je priložen v obliki Dodatka 6.

Priprava preskusnih koncentracij

15. Preskusna kemikalija se vmeša v tla. Organska topila, ki se uporabljajo kot pomoč pri tretiranju tal s preskusno kemikalijo, je treba izbrati na podlagi njihove nizke strupenosti za pršice, v načrt preskusa pa je treba vključiti ustrezno kontrolo s topilom (glej odstavek 29).

Preskusna kemikalija, topna v vodi

16. Raztopina preskusne kemikalije se pripravi v deionizirani vodi v količini, ki zadošča za vse ponovitve ene preskusne koncentracije. Priporočljivo je uporabljati zadostno količino vode, da se doseže zahtevana vsebnost vlage, tj. od 40 do 60 % največje vrednosti WHC (glej odstavek 12). Pred namestitvijo v preskusno posodo se vsaka raztopina preskusne kemikalije temeljito zmeša z eno šaržo predhodno navlaženih tal.

▼M6

Preskusna kemikalija, ki ni topna v vodi

17. Pri kemikalijah, ki niso topne v vodi, so pa topne v organskih topilih, se preskusna kemikalija lahko raztopi v najmanjši mogoči količini primernega vehikla (npr. acetona). Uporabljajo se lahko samo hlapna topila. Pri uporabi takih vehiklov morajo vse preskusne koncentracije in kontrola vsebovati enako najmanjšo količino vehikla. Vehikel se razprši na majhno količino, npr. 10 g, finega kremenovega peska ali pa se z njo zmeša. Skupno vsebnost peska v substratu je treba popraviti glede na to količino. Vehikel se odstrani tako, da vsaj eno uro izhlapeva v digestoriju. Ta zmes kremenovega peska in preskusne kemikalije je dodana predhodno navlaženim tlom in temeljito zmešana z dodajanjem ustrezne količine deionizirane vode, da se doseže zahtevana vlažnost. Končna mešanica se vnese v preskusne posode. Ne pozabite, da so nekatera topila lahko strupena za pršice. Če strupenost topila za pršice ni znana, je zato priporočljiva uporaba dodatne kontrole z vodo brez vehikla. Če je v zadostni meri dokazano, da topilo (v koncentracijah, ki bodo uporabljene) nima učinka, je kontrola z vodo lahko izključena.

Preskusna kemikalija, ki je slabo topna v vodi in organskih topilih

18. Pri kemikalijah, ki so slabo topne v vodi in organskih topilih, se ekvivalent 2,5 g fino mletega kremenovega peska na preskusno posodo (na primer 10 g finega kremenovega peska za štiri ponovitve) zmeša z določeno količino preskusne kemikalije, da nastane želena preskusna koncentracija. Skupno vsebnost peska v substratu je treba popraviti glede na to količino. Ta zmes kremenovega peska in preskusne kemikalije se doda predhodno navlaženim tlom ter po dodajanju ustrezne količine deionizirane vode temeljito zmeša, da se doseže zahtevana vsebnost vlage. Končna mešanica se porazdeli v preskusne posode. Postopek se ponovi za vsako preskusno koncentracijo, pripravi pa se tudi ustrezna kontrola.

POSTOPEK

Preskusne in kontrolne skupine

19. Za vsako kontrolno in tretirano posodo se priporoča deset odraslih samic v 20 g suhe mase umetnih tal. Preskusne organizme je treba dodati v dveh urah po pripravi substrata za dokončni preskus (tj. po vnosu preskusne snovi). V posebnih primerih (npr. ko staranje velja za odločilni dejavnik) je mogoče čas med pripravo substrata za dokončni preskus in dodajanjem pršic podaljšati (za podrobnosti takšnega staranja glej (18)). Vendar je treba v takšnih primerih podati znanstveno utemeljitev.

20. Po dodajanju pršic v tla se pršicam priskrbi hrana, treba pa je tudi izmeriti začetno težo vsake preskusne posode, ki se bo med celotnim preskusom uporabljala kot referenca za nadzor vsebnosti vlage v tleh, kot je opisano v odstavku 24. Nato se preskusne posode pokrijejo, kot je opisano v odstavku 8, in postavijo v preskusno komoro.

21. Za vsako od metod nanosa preskusne kemikalije, opisanih v odstavkih od 15 do 18, se pripravijo ustrezne kontrole. Za pripravo kontrol se upoštevajo ustrezni postopki, z izjemo dodajanja preskusne kemikalije. Zato se v kontrole, kjer je primerno, vnesejo organska topila, kremenov pesek ali drugi vehikli v koncentracijah/količinah, kot so uporabljene pri tretiranjih. Če je za dodajanje preskusni kemikaliji uporabljeno topilo ali drug vehikel, je treba pripraviti tudi dodatno kontrolo brez vehikla ali preskusne kemikalije in jo preskusiti, če strupenost topila ni znana (glej odstavek 17).

▼M6

Preskusni pogoji

22. Preskusna temperatura mora znašati 20 ± 2 °C. Temperaturo je treba vsaj enkrat dnevno zabeležiti in jo po potrebi prilagoditi. Preskus se izvaja v nadzorovanih ciklih svetlobe in teme (po možnosti 16 ur svetlobe in 8 ur teme) pri osvetljenosti od 400 do 800 luksov v bližini preskusnih posod. Zaradi primerljivosti so ti pogoji enaki kot v drugih ekotoksikoloških preskusih (npr. (15)).

23. Če so uporabljeni navojni pokrovčki, je treba s prezračevanjem preskusnih posod vsaj dvakrat tedensko zagotoviti izmenjavo plinov. Če so uporabljene prevleke iz gaze, je treba posebej paziti na vzdrževanje vsebnosti vlage v tleh (glej odstavka 8 in 24).

24. Vsebnost vode v talnem substratu v preskusnih posodah se z rednim tehtanjem preskusnih posod (npr. enkrat na teden) in po potrebi z dolivanjem vode v preskusne posode vzdržuje med celotnim preskusom. Izgube se po potrebi nadomeščajo z deionizirano vodo. Vsebnost vlage med preskusom se od začetne vrednosti ne sme razlikovati za več kot 10 %.

Hranjenje

25. Za primeren vir hrane so se izkazali gniloživi sirojedi (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)). Primerni so lahko tudi majhni skakači (npr. mladiči vrste *Folsomia candida* Willem, 1902, ali *Onychiurus fimatus* (19), (20), enhitreji (npr. *Enchytraeus crypticus*, Westheide in Graefe, 1992) ali nematode (npr. *Turbatrix silusiae*, de Man, 1913)) (21). Hrano je pred uporabo v preskusu priporočljivo preskusiti. Za izpolnjevanje meril za veljavnost morata biti vrsta in količina hrane takšni, da zagotavljata zadostno število mladičev (odstavek 6). Za izbiro plena je treba upoštevati način delovanja preskusne snovi (akaricid je npr. lahko strupen tudi za prehranske pršice, glej odstavek 26).

26. Hrano je treba priskrbeti *ad libitum* (tj. vsakič v majhni količini (konico lopatice)). V ta namen je mogoče uporabiti tudi nizkotlačni sesalnik, kot je predlagano pri preskusu s skakači, ali fin slikarski čopič. Običajno zadošča, če je hrana priskrbljena na začetku preskusa in od dva- do trikrat na teden. Če se zdi, da je preskusna snov za plen strupena, je treba razmisliti o večji pogostosti hranjenja in/ali drugem viru hrane.

Izbira preskusnih koncentracij

27. Predhodno poznavanje strupenosti preskusne kemikalije, npr. iz študij za določanje območja delovanja, bi moralo biti v pomoč pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij. Po potrebi se izvede preskus za določanje območja delovanja s petimi koncentracijami preskusne kemikalije v razponu 0,1 – 1 000 mg/kg suhih tal z vsaj eno ponovitvijo za tretirane skupine in kontrole. Preskus za določanje območja delovanja traja 14 dni, po tem pa se določita smrtnost odraslih pršic in število mladičev. Razpon koncentracije v dokončnem preskusu mora biti po možnosti izbran tako, da vključuje koncentracije, pri katerih obstaja vpliv na število mladičev, na preživetje generacije mater pa ne. Vendar to ni mogoče pri kemikalijah, ki pri zelo podobnih koncentracijah povzročajo smrtne in subletalne učinke. S koncentracijami, vključenimi v preskus, bi morala biti zajeta koncentracija z učinkom (npr. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) in razpon koncentracije, v katerem je zanimiv vpliv preskusne snovi. Ekstrapolacija veliko pod najnižjo koncentracijo, ki vpliva na preskusne organizme, ali veliko nad najvišjo preskušano koncentracijo se sme izvesti le v izjemnih primerih, v poročilu pa mora biti to podrobno razloženo.

Načrt poskusa

Preskusi odziva v odvisnosti od odmerka

28. Zato se na podlagi priporočil, ki izhajajo iz drugega krožnega preskusa (preskusa razmnoževanja enhitrejev (22)), predlagajo trije načrti poskusa.

▼M6

Splošna primernost vseh teh načrtov je bila potrjena z rezultatom validacije vrste *H. aculeifer*.

29. Pri določanju razpona koncentracij se upošteva naslednje:

— za določanje vrednosti EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}), je treba preskusiti dvanajst koncentracij. Priporočene so vsaj dve ponovitvi za vsako preskusno koncentracijo in šest kontrolnih ponovitev. Faktor razmika se lahko spreminja, tj. je v pričakovanem območju učinkov lahko manjši ali enak 1,8, pri višjih in nižjih koncentracijah pa je lahko nad 1,8;

— za določitev vrednosti NOEC je treba preskusiti vsaj pet koncentracij v geometrijski vrsti. Priporočene so štiri ponovitve za vsako preskusno koncentracijo in osem kontrol. Med koncentracijami mora biti razmik, katerega faktor ne sme presegati vrednosti 2,0;

— kombiniran pristop omogoča določitev vrednosti NOEC in ECx. Treba je uporabiti osem koncentracij za tretiranje v geometrijski vrsti. Priporočene so štiri ponovitve za vsako tretiranje in osem kontrol. Med koncentracijami mora biti razmik, katerega faktor ne sme presegati vrednosti 1,8.

Mejni preskus

30. Če pri največji koncentraciji v preskusu za določanje območja delovanja (tj. 1 000 mg/kg suhe teže tal) ni opaženih učinkov, se dokončni preskus razmnoževanja lahko izvede kot mejni preskus s koncentracijo 1 000 mg/kg suhe teže tal. Mejni preskus bo ponudil možnost dokazovanja, da je vrednost NOEC EC_{10} za razmnoževanje večja od mejne koncentracije, pri čemer bo število pršic, uporabljenih v preskusu, čim manjše. Za tretirana tla in kontrolo je treba uporabiti osem ponovitev.

Trajanje preskusa in meritve

31. Zabeležiti je treba vse opažene razlike med vedenjem in morfologijo pršic v kontrolnih in tretiranih posodah.

32. Na 14. dan se preživele pršice odstranijo iz tal z ekstrakcijo s toploto/svetlobo ali z drugo ustrezno metodo (glej Dodatek 5). Mladiči (tj. ličinke, protonimfe in deutonimfe) in odrasli osebki se preštejejo ločeno. Vse odrasle pršice, ki jih v tem trenutku ni mogoče najti, je treba zabeležiti kot mrtve, pri čemer se predpostavlja, da so te pršice pred ocenjevanjem umrle in se razkrojile. Učinkovitost ekstrakcije je treba validirati enkrat ali dvakrat na leto z znanimi količinami odraslih osebkov in mladičev. Učinkovitost mora v povprečju znašati več kot 90 %, združeno za vse razvojne faze (glej Dodatek 5). Število odraslih osebkov in število mladičev se ne prilagajata glede na učinkovitost.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

33. Informacije o statističnih metodah, ki se lahko uporabijo za analizo rezultatov preskusa, so podane v odstavkih od 36 do 41. Poleg tega je treba upoštevati dokument OECD št. 54 z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“ (31).

34. Glavna končna točka preskusa je sposobnost razmnoževanja, v tem primeru število mladičev, ustvarjenih na ponovitveno preskusno posodo (z vnesenimi 10 odraslimi samicami). Statistična analiza za sposobnost razmnoževanja zahteva izračun aritmetične sredine (X) in variance (s^2) na tretirano skupino

▼M6

in kontrolo. Vrednosti X in s^2 se uporabljata za postopke analize variance, kot so Studentov t-preskus, Dunnettov preskus in Williamsov preskus, ter za izračun 95-odstotnih intervalov zaupanja.

Opomba: ta glavna končna točka je enaka plodnosti, merjeni v obliki števila živečih mladičev, ustvarjenih med preskusom, deljenega s številom staršev-skih samic, vnesenih na začetku preskusa.

35. Število preživelih samic v netretiranih kontrolah je glavno merilo za veljav-nost in ga je treba dokumentirati. V končno poročilo je treba, tako kot pri preskusu za določanje območja delovanja, zabeležiti tudi vse druge škodljive znake.

Vrednost ECx

36. Vrednosti ECx, vključno z njihovimi pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi 95-odstotnimi mejami zaupanja za parameter, opisanimi v odstavku 34, se izračunajo z ustreznimi statističnimi metodami (npr. z analizo probit, logi-stično ali Weibullovo funkcijo, prilagojeno metodo Spearman-Karber ali enostavno interpolacijo). Vrednost EC_x je pridobljena tako, da je v navedeno enačbo vstavljena vrednost, ki ustreza x % srednje vrednosti kontrole. Za izračun vrednosti EC50 ali katere koli druge vrednosti EC_x je treba srednjo vrednost glede na tretirano skupino (X) analizirati z regresijsko analizo.

Vrednost NOEC/LOEC

37. Če je statistična analiza namenjena določanju vrednosti NOEC/LOEC, je potrebna statistika glede na posodo (posamezne posode se štejejo za pono-vitve). Uporabljene morajo biti ustrezne statistične metode (v skladu z doku-mentom OECD št. 54 z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“. V splošnem se s pomočjo enostransko zastavljenega (manj obsežnega) preskušanja domnev pri $p \leq 0,05$ proučijo škodljivi učinki preskusne snovi v primerjavi s kontrolo. Primeri so podani v naslednjih odstavkih.

38. Normalno porazdelitev podatkov je mogoče preskusiti npr. s preskusom ustreznosti Kolmogorov-Smirnov, preskusom razmerja med variacijskim razmikom in standardnim odklonom (preskusom R/s) ali Shapiro-Wilkovim preskusom (dvostranskim, $p \leq 0,05$). Za preskus homo-genosti variance se lahko uporabi Cochranov, Levenov ali Bartlettov preskus (dvostranski, $p \leq 0,05$). Če so izpolnjeni predpogoji postopkov parametričnega preskusa (normalnosti, homogenosti variance), je mogoče izvesti enofaktorsko analizo variance (enofaktorsko ANOVA) in nato preskuse večkratne primerjave. Za izračun, ali obstajajo značilne razlike ($p \leq 0,05$) med kontrolami in različnimi koncentracijami preskusnih snovi (izbira priporočljivega preskusa na podlagi dokumenta OECD št. 54 z naslovom Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo) je mogoče uporabiti večkratne primerjave (npr. Dunnettov t-preskus) ali regresivne trendnostne preskuse (npr. Williamsov preskus v primeru monotonega razmerja odmerek-odziv). V nasprotnem primeru je treba za določanje vrednosti NOEC in LOEC uporabiti nepara-metrične metode (npr. Bonferronijev U-preskus v skladu s trendnostnim preskusom po Holmu ali Jonckheere-Terpstraju).

Mejni preskus

39. Če je izveden mejni preskus (primerjava kontrole in samo ene tretirane skupine) in če so izpolnjeni predpogoji postopkov parametričnega preskusa (normalnost, homogenost), je mogoče s Studentovim preskusom (t-preskusom) preveriti odzive metrik. Če te zahteve niso izpolnjene, je mogoče uporabiti t-preskus za neenake variance (Welchev t-preskus) ali neparametrični preskus, kot je Mann-Whitneyjev U-preskus.

40. Za določanje značilnih razlik med kontrolami (kontrolo in kontrolo s topi-lom) je mogoče ponovitve vsake kontrole preskusiti, kot je opisano za mejni

▼M6

preskus. Če ti preskusi ne zaznajo značilnih razlik, je mogoče vse ponovitve kontrol in kontrol s topilom združiti. V nasprotnem primeru je treba vse tretirane vzorce primerjati s kontrolo s topilom.

Poročilo o preskusu

41. Poročilo o preskusu mora vključevati vsaj naslednje informacije:

— *Preskusna kemikalija*

— identiteta preskusne kemikalije, ime, serija, skupina in številka CAS, čistost,

— fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije (npr. log K_{ow}, topnost v vodi, parni tlak, Henryjevo konstanto (H) in po možnosti informacije o usodi preskusne kemikalije v tleh).

— *Preskusni organizmi*

— identifikacijski podatki in podatki o dobavitelju preskusnih organizmov, opis gojitvenih pogojev,

— razpon starosti preskusnih organizmov.

— *Preskusni pogoji*

— opis načrta in postopkov poskusa,

— podrobnosti o pripravi preskusnih tal; podrobno specifikacijo, če so uporabljena naravna tla (izvor, zgodovina, porazdelitev delcev glede na velikost, vrednost pH, vsebnost organske snovi in, če je na voljo, razvrstitev tal),

— največja zmogljivost zadrževanja vode,

— opis tehnike, uporabljene za nanos preskusne kemikalije na tla,

— podrobnosti o pomožnih kemikalijah, uporabljenih za dodajanje preskusne kemikalije,

— velikost preskusnih posod in suha masa preskusnih tal na posodo,

— preskusni pogoji: obsevanost, trajanje ciklov svetlobe in teme, temperatura,

— opis režima hranjenja, vrsta in količina hrane, uporabljene v preskusu, datumi hranjenja,

— vrednost pH in vsebnost vode v tleh na začetku preskusa in med njim (v kontroli in vsaki tretirani skupini),

— podroben opis metode ekstrakcije in učinkovitosti ekstrakcije.

— *Rezultati preskusa*

— število mladičev, ugotovljenih v vsaki preskusni posodi ob koncu preskusa,

— število odraslih samic in smrtnost odraslih osebkov (%) v vsaki preskusni posodi ob koncu preskusa,

— opis očitnih simptomov ali jasnih sprememb vedenja,

— rezultati, pridobljeni z referenčno preskusno kemikalijo,

— statistični povzetek (vrednost ECx in/ali NOEC), vključno s 95-odstotnimi mejami zaupanja, in opis metode izračuna,

▼**M6**

— grafični prikaz razmerja med koncentracijo in odzivom,

— odstopanja od postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, in morebitni nenavadni dogodki med preskusom.

LITERATURA

(1) Casanueva, M. E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21–46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259–274.

(3) Bakker, F. M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E. D., in van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73–77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2. izdaja. V: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 str.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). V: Dusbabek,F. in Bukva, V. (ur.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487–492.

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: str. 241–249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: str. 621–628.

(8) Krogh, P. H., in Axelsen, J. A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. V: Lokke, H. in van Gestel, C. A. M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, str. 239–251.

(9) Løkke, H., Janssen, C. R., Lanno, R. P., Römbke, J., Rundgren, S., in Van Straalen, N. M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. V: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P. W., Van Straalen, N. M. in Tarazona, J. V. (ur.). SETAC Press, Pensacola, ZDA. 128 str.

(10) Schlosser, H.-J., in Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). 1. del: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395–433.

(11) Schlosser, H.-J., in Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). 2. del: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N. F. 34, 413–433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K., in Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154–7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95– 122.

(14) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1994). Kakovost tal – Določevanje pH, št. 10390. ISO, Ženeva.

▼**M6**

(15) Poglavje C.8 te priloge, Strupenost za deževnike.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Poglavje 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195–209.

(17) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1993). Kakovost tal – Ugotavljanje suhe snovi in vsebnosti vode na osnovi mase – Gravimetrijska metoda, št. 11465. ISO, Ženeva.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P. W., Van Straalen, N. M., in Tarazona, J. V. (2002). Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, ZDA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges. allg. angew. Ent. 3:122– 125.

(20) Schlosser, H. J., in Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool. Beitr. N. F. 34(3):395–433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M., in Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130– 135.

(22) Poglavje C.32 te priloge, Preskus razmnoževanja enhitrejev.

(23) ISO (Mednarodna organizacija za standardizacijo) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, št. 11268-2. ISO, Ženeva.

(24) Southwood, T. R. E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2. izdaja). Chapman & Hall, London, 524 str.

(25) Dunger, W., in Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2. izdaja). G. Fischer, Jena, 539 str.

(26) Lesna, I., in Sabelis, M. W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes“ in a soil predatory mite. Nature 401, 581–583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103– 107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11–59.

(30) Kevan, D. K. McE., in Sharma, G. D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647–658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 54. ENV/JM/MONO(2006)18.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve pojmov

Pri tej preskusni metodi se uporabljajo naslednje opredelitve (v tem preskusu so vse učinkovite koncentracije izražene kot masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal):

Kemikalija pomeni snov ali zmes.

NOEC (koncentracija brez opaznega učinka) je koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri ni opaznega učinka. V tem preskusu koncentracija, ki ustreza vrednosti NOEC, v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$).

LOEC (najnižja koncentracija z opaznim učinkom) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki ima v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo statistično značilen učinek ($p < 0,05$).

ECx (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki na preskusnih organizmih v danem obdobju izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo učinkuje x-odstotno. Vrednost EC_{50} je, na primer, koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da na končno točko preskusa učinkuje 50-odstotno glede na izpostavljeno populacijo v določenem obdobju izpostavljenosti.

Preskusna kemikalija je snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

▼M6

Dodatek 2

Določanje največje zmogljivosti zadrževanja vode

Kot primerna velja naslednja metoda za določanje največje zmogljivosti zadrževanja vode v tleh. Opisana je v Dodatku C standarda ISO DIS 11268-2 (Kakovost tal – Vpliv onesnaževal na deževnike (*Eisenia fetida*). 2. del: Določevanje vplivov na razmnoževanje (23)).

S primerno napravo za vzorčenje (svedrastim vzorčevalnikom itd.) zberite določeno količino (npr. 5 g) substrata preskusnih tal. Pokrijte dno vzorčevalnika s koščkom filtrirnega papirja, napolnjenega z vodo, in vzorčevalnik nato postavite na stojalo v vodno kopel. Vzorčevalnik je treba postopoma potapljati, dokler nivo vode ni nad zgornjim delom tal. Nato ga je treba pustiti v vodi približno tri ure. Ker ni mogoče zadržati vse vode, ki jo absorbirajo talne kapilare, mora biti omogočeno, da se vzorec tal dve uri suši, tako da se vzorčevalnik postavi na ležišče iz zelo mokrega, fino mletega kremenovega peska, ki je nameščen v pokriti posodi (da se ne posuši). Nato je treba vzorec stehtati in pri 105 °C posušiti na konstantno maso. Zmogljivost zadrževanja vode (WHC) je nato mogoče izračunati po naslednjem postopku:

$$\mathrm{WHC(v\ \%\ suhe\ mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

pri čemer je:

S = z vodo nasičeni substrat + masa vzorčevalnika + masa filtrirnega papirja,

T = tara (masa vzorčevalnika + masa filtrirnega papirja),

D = suha masa substrata.

▼**M6**

Dodatek 3

Določanje vrednosti pH tal

Naslednja metoda za določanje vrednosti pH tal temelji na opisu v ISO 10390: Kakovost tal – Določevanje pH (16).

Določena količina tal se pri sobni temperaturi suši vsaj 12 ur. Nato se izdela suspenzija tal (ki vsebuje vsaj 5 gramov tal) v petkratni količini volumna tal z 1 M analitsko čistega kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M raztopine analitsko čistega kalcijevega klorida ($CaCl_2$). Suspenzija se nato pet minut temeljito stresa in se nato vsaj 2 uri in največ 24 ur pusti, da se usede. Vrednost pH tekoče faze se nato meri z merilnikom vrednosti pH, ki je pred vsako meritvijo umerjen z ustreznimi vrstami pufrskih raztopin (npr. pH 4,0 in 7,0).

▼M6

Dodatek 4

Gojenje vrste *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, prehranske pršice in sinhronizacija kulture

Gojenje vrste *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Kulture je mogoče hraniti v plastičnih posodah ali steklenih kozarcih, napolnjenih z zmesjo mavca/oglenega prahu (v razmerju 9: 1). Vlažnost mavca je po potrebi mogoče vzdrževati z dodajanjem nekaj kapljic destilirane ali deionizirane vode. Temperature gojenja so optimalne, če so v območju 20 ± 2 °C, režim svetlobe/teme pa za to vrsto ni pomemben. Plen so lahko pršice vrste *Typrophagus putrescentiae* ali *Caloglyphus* (s prehranskimi pršicami je treba ravnati previdno, ker lahko pri ljudeh povzročajo alergije), za plen pa so primerni tudi nematode, enhitreji ali skakači. Njihov vir mora biti zabeležen. Razvoj populacije je mogoče začeti z eno samo samico, ker se samci razvijejo iz neoplojenih jajčec. Generacije se večinoma prekrivajo. Samica lahko živi vsaj 100 dni in lahko med svojo življenjsko dobo odloži približno 100 jajčec. Največja hitrost odlaganja jajčec je dosežena med 10. in 40. dnem (po tem, ko samica odraste) in znaša 2,2 jajčeca na samico na dan. Čas razvoja od jajčeca do odrasle samice je približno 20 dni pri temperaturi 20 °C. Predhodno je treba vzdrževati in hraniti več kot eno kulturo.

Gojenje vrste *Typrophagus putrescentiae*:

Pršice so gojene v stekleni posodi, napolnjeni s finim prahom pivskega kvasa, ki je za preprečevanje pobega nameščen v plastično vedro, napolnjeno z raztopino KNO_3. Prehranske pršice se namestijo na vrh tega prahu. Nato se s pomočjo lopatice previdno zmešajo s prahom (ki ga je treba menjati dvakrat na teden).

Sinhronizacija kulture:

Osebki, uporabljeni v preskusu, morajo biti podobne starosti (približno 7 dni po tem, ko dosežejo fazo odraslosti). To se pri temperaturi gojenja 20 °C doseže na naslednji način:

Samice prenesite v čisto posodo za gojenje in dodajte dovolj hrane.

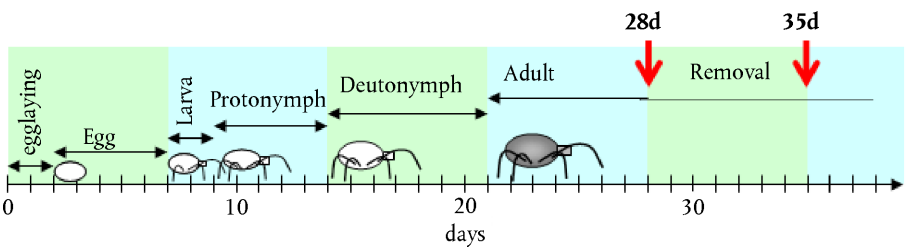
— Dopustite od dva do tri dni za odlaganje jajčec, odstranite samice.

— Odrasle samice med 28. in 35. dnem po tem, ko ste jih začeli nameščati v čiste posode za gojenje, odstranite za preskušanje.

Odrasle samice je mogoče zlahka ločiti od samcev in drugih razvojnih faz, ker so večje in bolj nabreknjene oblike ter imajo rjav dorzalni ščit (samci so vitkejši in ploski); barva neodraslih osebkov sega od bele do smetanaste. Razvoj pršic poteka približno po spodaj opisanem vzorcu, ki velja za temperaturo 20 °C (slika): jajčece 5 dni, ličinka 2 dni, protonimfa 5 dni, deutonimfa 7 dni, obdobje pred samičinim odlaganjem jajčec 2 dni. Potem so pršice odrasle.

Slika

Razvoj vrste *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* pri temperaturi 20 °C (odstranitev = samice, uporabljene za preskus).



▼**M6**

Odrasle preskusne živali se odstranijo iz sinhronizirane kulture in vnesejo v preskusne posode med 28. in 35. dnem po tem, ko so starševske samice začele odlagati jajčeca (tj. 7–14 dni po tem, ko so postale odrasle). S tem je zagotovljeno, da so preskusne živali že prešle obdobje pred odlaganjem jajčec in so se parile s samci, ki so tudi prisotni v posodi za gojenje. Opažanja pri laboratorijskih kulturah kažejo, da se samice parijo takoj ali kmalu po tem, ko odrastejo, če so prisotni samci (Ruf, Vaninnen, osebno opažanje). Obdobje sedmih dni je določeno zato, da je integracija v laboratorijsko rutino lažja in da je variabilnost razvoja posameznih osebkov med pršicami manjša. Obdobje odlaganja jajčec se mora začeti z vsaj enakim številom samic, ki je sčasoma potrebno za preskus (če je za preskus, na primer, potrebnih 400 samic, je treba dva ali tri dni omogočati odlaganje jajčec vsaj 400 samicam). Začetna točka za sinhronizirano populacijo mora biti vsaj 1 200 jajčec (razmerje med spoloma mora biti približno 0,5, smrtnost približno 0,2). Za preprečitev kanibalizma naj se v eni posodi ne goji več kot 20–30 samic, ki odlagajo jajčeca.

▼M6

Dodatek 5

Metode ekstrakcije

Ustrezna metoda za ločevanje osebkov iz tal/substrata pri mikropodih je ekstrakcija s toploto (glej spodnjo sliko). Metoda temelji na dejavnosti organizmov, zato je mogoče zabeležiti le mobilne osebke. Načelo ekstrakcije s toploto je postopno poslabševanje pogojev za organizme v vzorcu, tako da bodo zapustili substrat in padli v fiksirno tekočino (npr. etanol). Ključni točki sta trajanje ekstrakcije in poslabševanje pogojev za organizme od dobrih prek srednjih do slabih. Ekstrakcija mora biti pri ekotoksikoloških preskusih čim krajša, saj bi kakršna koli rast populacije med obdobjem ekstrakcije pokvarila rezultate. Po drugi strani morajo biti pogoji glede temperature in vlage v vzorcu vedno v takšnem območju, ki pršicam omogoča gibanje. Ogrevanje vzorca tal izsuši substrat. Če je izsuševanje prehitro, se lahko izsušijo tudi nekatere pršice, še preden uspejo pobegniti.

Zato je predlagan naslednji postopek (24) (25):

Naprava: Tullgrenovi lijaki ali primerljive metode, kot je npr. McFadyenova (ogrevanje od zgoraj, vzorec je položen nad lijak).

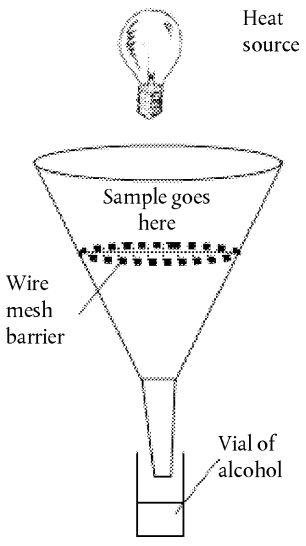
Režim ogrevanja: 25 °C za 12 ur, 35 °C za 12 ur, 45 °C za 24 ur (skupaj 48 ur). Temperaturo je treba meriti v substratu.

Fiksirna tekočina: 70-odstotni etanol

Podrobnosti: vzemite stekleno fiolo, ki je bila uporabljena v preskusu. Odstranite pokrov in okrog odprtine ovijte kos mreže ali tkanine. Velikost očesa na mrežici tkanine mora biti od 1,0 do 1,5 mm. Tkanino pritrdite z elastičnim trakom. Fiolo previdno obrnite okrog in jo postavite v napravo za ekstrakcijo. Tkanina preprečuje, da bi substrat pronical v fiksirno tekočino, pršicam pa omogoča, da lahko zapustijo vzorec. Z režimom ogrevanja začnite po tem, ko so vstavljene vse fiole. Ekstrakcijo končajte po 48 urah. Odstranite fiksirne fiole in s stereomikroskopom preštejte pršice.

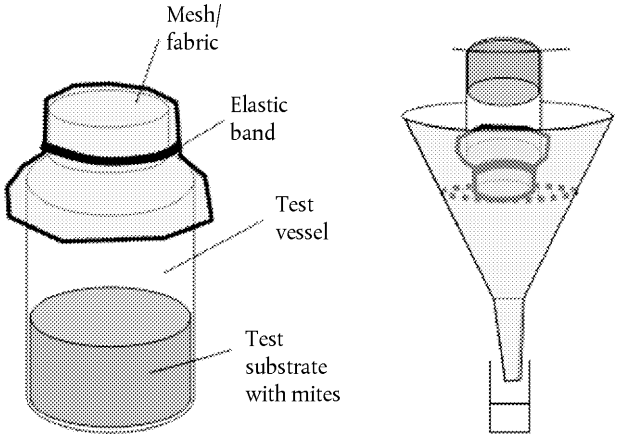
Učinkovitost ekstrakcije pri izbrani metodi mora biti dokazana enkrat ali dvakrat letno z uporabo posod, ki vsebujejo znano število mladih in odraslih pršic, gojenih v netretiranem preskusnem substratu. Učinkovitost mora v povprečju znašati ≥ 90 %, združeno za vse razvojne faze.

Tullgrenova vrsta naprave za ekstrakcijo



▼**M6**

Način priprave preskusne fiole po koncu preskusa, pred ekstrakcijo



▼**M6**

Dodatek 6

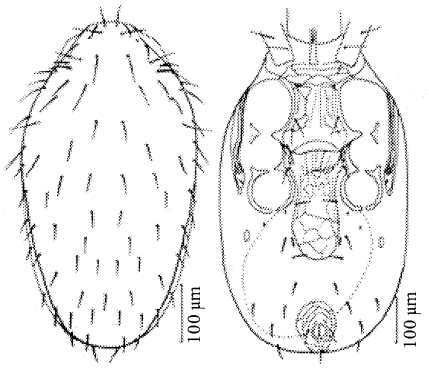
Identifikacija vrste *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Podrazred/red/podred:	Družina:	Rod/podrod/vrsta:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

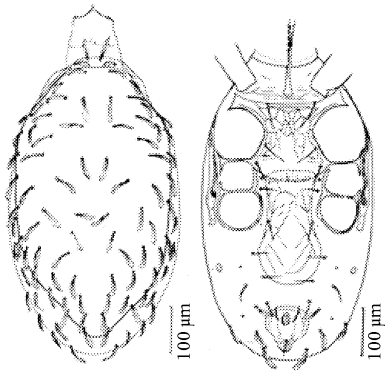
Avtor in datum:	Dr. F. Faraji, (MITOX), 23. januar 2007.

Uporabljena literatura:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, druga, revidirana izdaja: 1–523. Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 str. Krantz, G. W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 str.

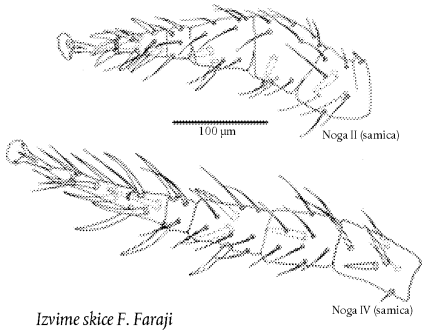
Določevalne lastnosti:	Tektum z zaokroženim zobčastim robom; žlebiči hipostome z več kot 6 dentikli; kavdalne dorzalne sete Z4 niso zelo dolge; dlakaste dorzalne sete; normalen genitalni ščit, ni zelo povečan in ne dosega analnega ščita; zadnja polovica dorzalnega ščita brez set, ki nimajo parov; noge II in IV z nekaj gostimi makrosetami; dorzalna seta Z5 približno dvakrat daljša od J5; fiksni člen helicere z 12–14 zobmi in gibljivi člen z 2 zoboma; idiosoma dolga 520–685 μm. Vrsta *Hypoaspis miles* se uporablja tudi pri biološkem nadzoru in jo je mogoče zamenjati z vrsto *H. aculeifer*. Glavna razlika je naslednja: vrsta *H. miles* pripada podrodu *Cosmolaelaps* in ima dorzalne sete v obliki noža, vrsta *H. aculeifer* pa pripada podrodu *Geolaelaps* in ima dorzalne sete v obliki ščetin.



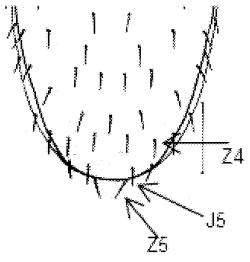
Hypoaspis aculeifer po Hughes, 1976



Hypoaspis miles po Hughes, 1976



Izvirne skice F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
dorzalni ščit z značilnimi setami

▼M6

Dodatek 7

Osnovne informacije o biologiji vrste *hypoaspis (geolaelaps) aculeifer*

Vrsta *Hypoaspis aculeifer* pripada družini Lealapidae, redu Acari (pršice), razredu Arachnida, plemenu Arthropoda. Njeni pripadniki živijo v vseh vrstah tal in se hranijo z drugimi pršicami, nematodami, enhitreji in skakači (26). Če je hrane premalo, preidejo na kanibalizem (27). Telo plenilskih pršic je segmentirano na idiosomo in gnatosomo. Manjka jasno razločevanje idiosome v prosomi (glavi) in opistosomi (zadku). Gnatosoma (ščit glave) vsebuje organe za hranjenje, kot so palpi in helicere. Helicere so razcepljene na tri dele in imajo zobe različnih oblik. Razen za zaužitje hrane samci svoje helicere uporabljajo v glavnem za prenos spermatoforov v samice. Dorzalni ščit idiosomo pokriva skoraj v celoti. Velik del idiosome pri samici zavzemajo reproduktivni organi, ki so še posebej razločni tik pred odlaganjem jajčec. Ventralno je mogoče najti dva ščita, sternalnega in genitalnega. Vse noge imajo ščetine in trne. S ščetinami se pršice pri premikanju ali na površini tal zasidrajo. Prvi par nog v glavnem uporabljajo kot antene. Drugi par nog uporabljajo ne le za premikanje, temveč tudi za to, da se pritrdijo na plen. Trni četrtega para nog lahko služijo kot zaščita, pa tudi kot „pogon“ (28). Samci v dolžino merijo 0,55–0,65 mm, tehtajo pa 10–15 µg. Samice v dolžino merijo 0,8–0,9 mm, tehtajo pa 50–60 µg (8)(28) (slika 1).

Slika 1

Samica, samec, protonimfa in ličinka vrste *H. aculeifer*.



Pri temperaturi 23 °C pršice spolno dozorijo po 16 dneh (samice) oziroma 18 dneh (samci) (6). Samice prenašajo spermije v spolni odprtini, od koder bodo nato preneseni v jajčnik. V jajčniku spermiji zorijo in se shranijo. Do oploditve pride šele, ko spermiji v jajčniku dozorijo. Samice bodo oplojena ali neoplojena jajčeca odložile v grudah ali ločeno, po možnosti v špranje ali odprtine. Pršice, ki so se parile, lahko nosijo mladiče obeh spolov, iz jajčec samic, ki se niso parile, pa se izležejo samo mladiči moškega spola. Pršica v času razvoja do odraslosti preide štiri faze (jajčece – ličinka, ličinka – protonimfa, protonimfa – deutonimfa, deutonimfa – odrasli osebek).

Jajčece je mlečno belo, prosojno, ovalno in dolgo približno 0,37 mm ter ima trdno ovojnico. Glede na (8) ličinke merijo 0,42–0,45 mm. Imajo le tri pare nog. Na področju glave se razvijejo palpi in helicere. Helicere se uporabljajo za izvalitev iz jajčeca, saj imajo nekaj majhnih dentiklov. Po prvi levitvi, 1–2 dni po izvalitvi, se razvijejo protonimfe. Prav tako so bele, merijo 0,45–0,62 mm (8) in imajo štiri pare nog. Prisotni so vsi zobje na helicerah. Pršice v tem stadiju

▼**M6**

začnejo iskati hrano. V ta namen s helicerami prebodejo kutikulo plena in v plen izbrizgajo izloček za zunajčrevesno prebavo. Nato pršica hrano v obliki kaše lahko posrka. Helicere lahko uporabijo tudi za trganje večjih delov hrane (28). Po še eni levitvi se razvijejo deutonimfe. Merijo 0,60–0,80 mm (8) in so rumene do svetlo rjave barve. V tej fazi jih je mogoče ločiti na samice in samce. Po dodatni levitvi, med katero živali niso dejavne in se razvija rjavi ščit (po približno 14 dneh), pršice postanejo odrasle (28)(29)(30). Pri temperaturi 25 °C je njihova življenjska doba med 48 in 100 dnevi (27).

▼**M6**

Dodatek 8

Povzetek in časovni razpored glavnih ukrepov, ki jih je treba izvesti za preskus z vrsto *hypoaspis*

Čas (dnevi) začetek preskusa = dan 0	Dejavnost/opravilo
Dan od – 35 do – 28	Prenesite samice iz založne kulture v čiste posode, da začnete sinhronizacijo. Dva dni pozneje: odstranitev samic. Dva- do trikrat na teden: priskrbite dovolj hrane.
Dan – 5 (± 2)	Pripravite umetna tla.
Dan – 4 (± 2)	Določite WHC umetnih tal. Čez noč posušite. Naslednji dan: stehtajte vzorce in izračunajte WHC.
Dan – 4 (± 2)	Predhodno navlažite umetna tla, da dosežete 20–30 % WHC.
Dan 0	Začnite preskus: dodajte preskusno kemikalijo umetnim tlom. V vsako ponovitev vnesite 10 samic. Stehtajte vsako ponovitev. Pripravite abiotske kontrole za vsebnost vlage in vrednost pH, 2 ponovitvi za vsako tretiranje. Čez noč posušite kontrole vlage. Naslednji dan: stehtajte kontrole vlage. Naslednji dan: izmerite vrednost pH posušenih abiotskih kontrol.
Dnevi 3, 6, 9, 12 (pribl.)	Vsaki ponovitvi priskrbite zadostno količino organizmov, ki predstavljajo plen. Vsako ponovitev stehtajte in sčasoma dodajte izhlapelo vodo.
Dan 14	Dokončajte preskus, pripravite ekstrakcijo za vse ponovitve in kontrole učinkovitosti ekstrakcije. Čez noč posušite kontrole vsebnosti vode. Naslednji dan: stehtajte kontrole vsebnosti vode. Naslednji dan: izmerite vrednost pH posušenih kontrol.
Dan 16	Dokončajte ekstrakcijo.
Dan 16+	Zabeležite število odraslih osebkov in mladičev v ekstrahiranem materialu. O rezultatih poročajte v obliki preglednic. O postopku preskušanja poročajte na listih za protokol preskusa.

▼M6

C.37 21-DNEVNI PRESKUS RIB: KRATKOTRAJNO PRESEJALNO PRESKUŠANJE ESTROGENEGA IN ANDROGENEGA DELOVANJA TER ZAVIRANJA AROMATAZE

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 230 (2009). Preskus rib, s katerim je mogoče zaznati nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij zaradi interakcije teh kemikalij z endokrinim sistemom povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih povzročiteljev endokrinih motenj. Del naloge je bila priprava smernic za presejalno preskušanje kemikalij, ki so aktivne v endokrinem sistemu ribjih vrst. 21-dnevni presejalni preskus endokrinega delovanja pri ribah je prestal obsežen validacijski program, ki je vključeval medlaboratorijske študije z izbranimi kemikalijami, s katerimi sta bili dokazani ustreznost in zanesljivost preskusa za zaznavanje estrogenih kemikalij in kemikalij, ki zavirajo aromatazo (1) (2) (3) (4) (5), pri treh proučevanih vrstah rib (črnoglavem pisancu, japonski medaki in cebrici); zaznavanje androgenega delovanja je mogoče pri črnoglavem pisancu in medaki, vendar ne pri cebrici. S to preskusno metodo ni mogoče zaznati antiandrogenih kemikalij. Delo v zvezi z validacijo je pregledala skupina strokovnjakov, ki so jih imenovali nacionalni koordinatorji programa smernic za preskušanje (6). Preskus ni namenjen opredelitvi posebnih mehanizmov hormonskih motenj, ker imajo živali nepoškodovano os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze (HPG), ki se lahko odziva na kemikalije, ki vplivajo na os HPG na različnih ravneh. Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib (OECD TG 229) vključuje plodnost in, kot je primerno, histopatologijo spolnih žlez črnoglavega pisanca ter vse končne točke, ki jih zajema ta preskusna metoda. V OECD TG 229 so zajeti presejalni preskusi kemikalij, ki vplivajo na razmnoževanje prek različnih mehanizmov, vključno z endokrinimi načini. To je treba upoštevati pred izbiro najprimernejše preskusne metode.

2. V tej preskusni metodi je opisan presejalni preskus *in vivo*, v katerem se spolno zreli ribji samci in drsteče se ribje samice zadržujejo skupaj ter so izpostavljeni kemikaliji v omejenem delu njihovega življenjskega cikla (21 dni). Ob koncu 21-dnevnega obdobja izpostavljenosti se pri samcih in samicah izmerita ena ali dve, odvisno od uporabljene vrste, končni točki biomarkerja kot kazalnika estrogenega delovanja, zaviranja aromataze ali androgenega delovanja preskusne kemikalije; te končne točke so vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti. Vitelogenin se meri pri črnoglavem pisancu, japonski medaki in cebrici, sekundarne spolne značilnosti pa se merijo le pri črnoglavem pisancu in japonski medaki.

3. Biološki preskus je presejalni preskus *in vivo* za nekatere endokrine načine delovanja, njegovo uporabo pa je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira za preskušanje in oceno kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje, „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (28).

ZAČETNI POMISLEKI IN OMEJITVE

4. Vitelogenin običajno proizvajajo jetra samic oviparnih vretenčarjev kot odziv na kroženje endogenega estrogena. Je predhodna sestavina beljakovin jajčnega rumenjaka, ki po nastanku v jetrih potuje po krvnem obtoku do jajčnika, kjer jo absorbirajo in spremenijo razvijajoča se jajčeca. Vitelogenina v plazmi nezrelih ribjih samic in samcev skoraj ni mogoče zaznati, ker nimajo dovolj krožečega estrogena; jetra pa so sposobna sinteze in izločanja vitelogenina kot odziv na spodbujanje eksogenega estrogena.

▼M6

5. Meritev vitelogenina je namenjena zaznavanju kemikalij z različnimi estrogenimi načini delovanja. Zaznavanje estrogenih kemikalij je mogoče z meritvijo indukcije vitelogenina pri ribjih samcih in je bilo obsežno dokumentirano v strokovno pregledani znanstveni literaturi (npr. (7)). Indukcija vitelogenina je bila dokazana tudi po izpostavljenosti androgenom, ki se lahko aromatizirajo (8) (9). Zaradi zmanjšanja ravni kroženja estrogena pri samicah, na primer z zaviranjem aromataze, ki spremeni endogeni androgen v naravni estrogen 17β-estradiol, se zmanjša raven vitelogenina, ki se uporablja za zaznavanje kemikalij, ki imajo lastnosti zaviranja aromataze (10) (11). Biološka pomembnost odziva vitelogenina na zaviranje estrogena/aromataze je bila dokazana in obsežno dokumentirana. Vendar je mogoče, da lahko na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna strupenost in neendokrini strupeni načini delovanja, npr. hepatotoksičnost.

6. Več merilnih metod je bilo uspešno pripravljenih in standardiziranih za redno uporabo. Med njimi so metode encimskega imunskega testa (ELISA), ki so specifične za posamezne vrste in uporabljajo imunokemijo za kvantifikacijo vitelogenina, nastalega v majhnih vzorcih krvi ali jeter, ki so bili odvzeti pri posameznih ribah (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Za meritev VTG se vzorčijo kri črnoglavega pisanca, kri ali homogenat glave/repa cebrice in jetra medake. Pri medaki je korelacija med VTG, izmerjenim v krvi, in VTG, izmerjenim v jetrih, dobra (19). V Dodatku 6 so navedeni priporočeni postopki za odvzem vzorcev za analizo vitelogenina. Kompleti za merjenje vitelogenina so lahko dostopni; taki kompleti morajo temeljiti na validirani metodi ELISA, ki je specifična za posamezno vrsto.

7. Sekundarne spolne značilnosti ribjih samcev nekaterih vrst so izjemno vidne, jih je mogoče kvantificirati in se odzivajo na ravni kroženja endogenih androgenov; to velja za črnoglavega pisanca in medako, vendar ne za cebrico, ki nima sekundarnih spolnih značilnosti, ki jih je mogoče kvantificirati. Samice so sposobne razviti moške sekundarne spolne značilnosti, če so izpostavljene androgenim kemikalijam v vodi. V znanstveni literaturi je na voljo več študij, ki dokumentirajo te vrste odziva pri črnoglavem pisancu (20) in medaki (21). Zmanjšanje sekundarnih spolnih značilnosti pri samcih je treba zaradi majhne statistične moči razlagati previdno, pri čemer mora razlaga temeljiti na strokovni presoji in zanesljivosti dokazov. Ker cebrica nima sekundarnih spolnih značilnosti, ki jih je mogoče kvantificirati in se odzivajo na kemikalije z androgenim delovanjem, je njena uporaba v tem preskusu omejena.

8. Pri črnoglavem pisancu je glavni kazalnik eksogene androgene izpostavljenosti število drstnih izpuščajev na nosu ribje samice. Pri medaki je glavni označevalec eksogene izpostavljenosti androgenim kemikalijam pri ribjih samicah število bradavičastih podaljškov. V Dodatku 5A in Dodatku 5B so navedeni priporočeni postopki za spremljanje vrednotenja spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu oziroma medaki.

9. Opredelitve pojmov, uporabljene v tej preskusni metodi, so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

10. V preskusu so ribji samci in samice v razmnoževalnem stanju skupaj izpostavljeni v preskusnih posodah. Njihovo odraslo in razmnoževalno stanje omogočata jasno razlikovanje po spolu in zato s spolom povezano analizo posamezne končne točke ter zagotavljata njihovo občutljivost na eksogene

▼M6

kemikalije. Ob koncu preskusa se spol potrdi z makroskopskim pregledom spolnih žlez po ventralnem odprtju trebuha s škarjami. Pregled zadevnih pogojev biološkega preskusa je naveden v Dodatku 2. Preskus se običajno začne z ribo, ki je bila vzorčena iz populacije, ki se drsti; starajoče se živali se ne smejo uporabiti. Smernice glede starosti rib in razmnoževalnega stanja so navedene v razdelku Izbira rib. Preskus se izvede s tremi koncentracijami kemikalije za izpostavljanje, kontrolo z vodo in po potrebi kontrolo s topilom. Pri medaki in cebrici se uporabita dve posodi ali ponovitvi na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 5 samcev in 5 samic), pri črnoglavem pisancu pa štiri posode ali ponovitve na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 2 samca in 4 samice). To je namenjeno prilagoditvi teritorialnega vedenja samcev črnoglavega pisanca ob hkratni ohranitvi ustrezne moči preskusa. Izpostavljenost traja 21 dni, vzorčenje rib pa se izvaja 21. dan izpostavljenosti.

11. Pri vzorčenju na 21. dan se vse živali humano usmrtijo. Sekundarne spolne značilnosti se merijo pri črnoglavem pisancu in medaki (glej Dodatek 5A in Dodatek 5B); vzorci krvi se za določanje vitelogenina odvzamejo pri cebrici in črnoglavem pisancu, pri čemer se lahko pri cebricah namesto tega za določanje vitelogenina odvzame glava/rep (Dodatek 6), za analizo VTG pri medaki pa se odvzamejo jetra (Dodatek 6).

MERILA ZA SPREJEMLJIVOST PRESKUSA

12. Za sprejemljivost rezultatov preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— smrtnost v kontrolah z vodo (ali topilom) ob koncu obdobja izpostavljenosti ne sme preseči 10 %,

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti v celotnem obdobju izpostavljenosti vsaj 60 % nasičenosti z zrakom (ASV),

— razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih posodah v obdobju izpostavljenosti nikoli ne sme biti večja od ± 1,5 °C in jo je treba vzdrževati v razponu 2 °C znotraj temperaturnih razponov, ki so določeni za preskusno vrsto (Dodatek 2),

— na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti.

OPIS METODE

Oprema

13. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

(a) oksimetri in merilniki pH;

(b) oprema za določanje trdote in alkalnosti vode;

(c) ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje;

(d) bazeni, izdelani iz kemijsko inertnih materialov, ter primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej Dodatek 2);

(e) substrat za drstenje črnoglavega pisanca in cebrice; potrebne podrobnosti so navedene v Dodatku 4;

(f) primerna točna tehtnica (tj. točna do ± 0,5 mg).

▼M6

Voda

14. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri kaže preskusna vrsta primerno dolgotrajno preživetje in rast. V času preskusa mora biti voda konstantne kakovosti. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, v enem preskusu pa mora biti v območju ± 0,5 pH enote. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije), je treba v časovnih razmikih odvzemati vzorce za analizo. Izvajati je treba meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} in SO_4^{2-}), pesticidov (npr. skupnih organofosfornih in skupnih organoklornih pesticidov), skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje razmeroma konstantne kakovosti. Če se dokaže, da je bila kakovost vode konstantna vsaj eno leto, se lahko meritve izvajajo manj pogosto, časovni razmiki pa se lahko podaljšajo (npr. na vsakih šest mesecev). Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 3.

Preskusne raztopine

15. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem založne raztopine. Založno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem ali ultrazvočnim razbijanjem). Za pridobitev primerno koncentrirane založne raztopine se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine. Uporaba topila kot nosilca ni priporočena. Če je topilo potrebno, je treba vzporedno izvajati kontrolo s topilom z enako koncentracijo topila kot pri kemičnih obdelavah. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, je lahko topilo tehnično najboljša rešitev; upoštevati je treba Smernico OECD za preskušanje strupenosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (22). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti kemikalije. V Smernici OECD se priporoča največ 100 µl/l, kar je treba upoštevati. Vendar so bili v zadnjem pregledu (23) izraženi dodatni pomisleki glede uporabe topil za preskušanje endokrinega delovanja. Zato se priporoča, da se koncentracije topila po potrebi čim bolj zmanjšajo, kadar koli je to tehnično izvedljivo (odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije).

16. Uporabil se bo pretočni preskusni sistem. Tak sistem stalno odmerja in redči založno raztopino preskusne kemikalije (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik in sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok založnih raztopin in vode za redčenje je treba preverjati v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsak dan, med preskusom in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Izogibati se je treba uporabi nizkokakovostnega cevnega materiala ali drugih materialov, ki lahko vsebujejo biološko aktivne kemikalije. Pri izbiri materiala za pretočni sistem je treba upoštevati morebitno adsorpcijo preskusne kemikalije v ta material.

Vzdrževanje rib

17. Preskusne ribe je treba izbrati iz laboratorijske populacije, po možnosti iz enega staleža, ki so se vsaj dva tedna pred preskusom aklimatizirale, kar zadeva kakovost vode in osvetljenost, v pogojih, podobnih tistim, ki se uporabijo v preskusu. Pomembno je, da sta obremenitev in gostota rib (za opredelitvi glej Dodatek 1) primerni za uporabljene preskusne vrste (glej Dodatek 2).

18. Po 48 urah od naselitve se zabeleži smrtnost, pri čemer se uporabijo naslednja merila:

▼M6

— smrtnost v sedmih dneh je večja od 10 % populacije: celotna serija se zavrne,

— smrtnost med 5 in 10 % populacije: aklimatizacija sedem dodatnih dni; če je v drugih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se zavrne celotna serija,

— smrtnost v sedmih dneh manjša od 5 % populacije: serija se sprejme.

19. Bolezni rib se v obdobju aklimatizacije, obdobju pred izpostavljenostjo ali v obdobju izpostavljenosti ne smejo zdraviti.

Predhodna izpostavljenost in izbira rib

20. Priporoča se enotedensko obdobje predhodne izpostavljenosti, pri čemer so živali v posodah, podobnim posodam v dejanskem preskusu. Ribe je treba v celotnem obdobju vzdrževanja in med fazo izpostavljenosti hraniti *ad libitum*. Faza izpostavljenosti se začne s spolno dimorfnimi odraslimi ribami iz laboratorijske zaloge razmnoževalno zrelih živali (npr. z jasno vidnimi sekundarnimi spolnimi značilnostmi pri črnoglavem pisancu in medaki) in aktivnim drstenjem. Na splošno (vendar se to ne sme upoštevati brez opazovanja dejanskega razmnoževalnega stanja zadevne serije rib) morajo biti črnoglavi pisanci stari približno 20 (±2) tednov, če so bili v celotni življenjski dobi gojeni pri 25 ± 2 °C. Japonske medake morajo biti stare približno 16 (±2) tednov, če so bile v celotni življenjski dobi gojene pri 25 ± 2 °C. Cebrice morajo biti stare približno 16 (±2) tednov, če so bile v celotni življenjski dobi gojene pri 26 ± 2 °C.

NAČRT PRESKUSA

21. Uporabijo se tri koncentracije preskusne kemikalije, ena kontrola (z vodo) in po potrebi ena kontrola s topilom. Podatki se lahko analizirajo, da se določijo statistično značilne razlike med odzivi na tretiranje in odzivi v kontrolah. Te analize bodo pokazale, ali je za kemikalijo potrebno nadaljnje dolgotrajno preskušanje glede škodljivih učinkov (in sicer preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje) namesto uporabe za oceno tveganja (24).

22. Pri cebrici in medaki se na 21. dan poskusa samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (5 samcev in 5 samic v vsaki od dveh ponovitev) ter kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina in sekundarnih spolnih značilnosti, če je primerno. Pri črnoglavem pisancu se na 21. dan izpostavljenosti samci in samice iz posameznih ravni tretiranja (2 samca in 4 samice v vsaki od štirih ponovitev) in kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina in sekundarnih spolnih značilnosti.

Izbira preskusnih koncentracij

23. Za namen tega preskusa je treba najvišjo preskusno koncentracijo določiti z najvišjo tolerančno koncentracijo (MTC), ki se določi z napravo za ugotavljanje razpona ali na podlagi drugih podatkov o strupenosti, ali 10 mg/l ali največjo topnostjo v vodi, odvisno od tega, katera vrednost je nižja. MTC je opredeljena kot najvišja preskusna koncentracija kemikalije, ki povzroči manj kot 10-odstotno smrtnost. Pri uporabi tega pristopa se domneva, da obstajajo empirični podatki o akutni strupenosti ali drugi podatki o strupenosti, na podlagi katerih je mogoče oceniti MTC. Ocena MTC je lahko netočna, pri čemer je običajno potrebna strokovna presoja.

▼M6

24. Potrebne so tri preskusne koncentracije, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ne presega 10, in kontrola z vodo za redčenje (ter po potrebi kontrola s topilom). Priporoča se razpon faktorjev razmika med 3,2 in 10.

POSTOPEK

Izbira in tehtanje preskusnih rib

25. Pomembno je, da se že na začetku preskusa čim bolj zmanjša variacija teže rib. Primerni razponi velikosti za različne vrste, priporočene za uporabo v tem preskusu, so navedeni v Dodatku 2. Za celotno serijo rib, uporabljenih v preskusu, je treba teže posameznih ribjih samcev in samic na začetku preskusa po možnosti vzdrževati v razponu ± 20 % aritmetične sredine teže istega spola. Priporočljivo je, da se pred preskusom stehta podvzorec staleža rib, da se oceni srednja teža.

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

26. Preskus traja 21 dni po obdobju predhodne izpostavljenosti. Priporočeno obdobje predhodne izpostavljenosti traja en teden.

Hranjenje

27. Ribe je treba hraniti *ad libitum* s primerno hrano (Dodatek 2) dovolj pogosto, da se vzdržuje telesna kondicija. Paziti je treba, da ne pride do rasti mikrobov in kalnosti vode. Kot splošna smernica se lahko dnevni obrok razdeli na dva ali tri enake dele za večkratno krmljenje, pri čemer morajo med posameznimi krmljenji preteči vsaj tri ure. En večji obrok je sprejemljiv zlasti ob vikendih. Hranjenje rib je treba prekiniti 12 ur pred vzorčenjem/nekropsijo.

28. Ribjo hrano je treba oceniti glede na prisotnost onesnaževal, kot so organoklorni pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in poliklorirani bifenili (PCB). Izogibati se je treba hrani z višjo ravnjo fitoestrogenov, ki bi lahko ogrozili odziv preskusa na znani agonist estrogena (npr. 17-beta estradiol).

29. Neprebavljeno hrano in iztrebke je treba odstraniti iz preskusnih posod vsaj dvakrat na teden, npr. s previdnim čiščenjem dna posameznega bazena z uporabo sesalne natege.

Svetloba in temperatura

30. Obdobje osvetljenosti in temperatura vode morata biti ustrezna za preskusno vrsto (glej Dodatek 2).

Pogostost analitskih določitev in meritev

31. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije. Vzpostaviti je treba vse potrebne analitske metode, vključno z zadostnim znanjem o stabilnosti kemikalije v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določijo v rednih časovnih razmikih, kot sledi: pretoke redčila in založne raztopine strupene snovi je treba po možnosti preveriti vsak dan, vendar vsaj dvakrat na teden, pri čemer se ves čas preskusa ne smejo razlikovati za več kot 10 %. Priporoča se, da se dejanske koncentracije preskusne kemikalije izmerijo v vseh posodah na začetku preskusa in nato v tedenskih časovnih razmikih.

32. Priporoča se, da rezultati temeljijo na merjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali merjenih vrednostih.

33. Vzorce bo morda treba filtrirati (npr. z uporabo filtra z velikostjo por 0,45 μm) ali centrifugirati. Če je filtracija potrebna, je priporočeni postopek centrifugiranje. Če pa se preskusni material ne adsorbira na filtre, je lahko sprejemljivo tudi filtriranje.

▼M6

34. Med preskusom je treba vsaj enkrat na teden v vseh preskusnih posodah izmeriti raztopljeni kisik, temperaturo in pH. Skupno trdoto in alkalnost je treba vsaj enkrat na teden izmeriti v kontrolah in eni posodi pri najvišji koncentraciji. Temperatura se po možnosti stalno spremlja v vsaj eni preskusni posodi.

Opažanja

35. Med potekom preskusa ali ob prekinitvi preskusa se ocenijo številni splošni (npr. preživetje) in glavni biološki odzivi (npr. ravni vitelogenina). Meritev in vrednotenje teh končnih točk ter njihova uporabnost so opisani v nadaljevanju.

Preživetje

36. Ribe je treba v obdobju preskusa pregledati vsak dan, vsako smrtnost zabeležiti, mrtve ribe pa čim prej odstraniti. Mrtve ribe se ne smejo nadomestiti niti v kontrolnih posodah niti v tretiranih posodah. Spol rib, ki poginejo med preskusom, je treba določiti z makroskopskim vrednotenjem spolnih žlez.

Obnašanje in videz

37. Vsako nenormalno obnašanje (glede na kontrole) je treba zabeležiti; to lahko vključuje znake splošne strupenosti, vključno s hiperventilacijo, nekoordiniranim plavanjem, izgubo ravnotežja in netipičnim mirovanjem ali hranjenjem. Zabeležiti je treba tudi zunanje nenormalnosti (kot sta hemoragija in razbarvanje). Take znake strupenosti je treba pri razlagi podatkov previdno obravnavati, ker lahko nakazujejo koncentracije, pri katerih biomarkerji endokrinega delovanja niso zanesljivi. Taka opažanja v zvezi z obnašanjem lahko zagotovijo tudi koristne kvalitativne informacije, ki kažejo mogoče zahteve za prihodnje preskušanje rib. Na primer teritorialna agresivnost normalnih samcev ali maskuliniziranih samic je bila opažena pri črnoglavem pisancu, ki je bil izpostavljen androgenemu delovanju; pri cebrici se značilno obnašanje pri parjenju in drstenju po svitanju zmanjša ali ga ovira izpostavljenost estrogenemu ali antiandrogenemu delovanju.

38. Ker se lahko nekateri vidiki videza (zlasti barva) pri rokovanju hitro spremenijo, je pomembno, da se kvalitativno opazovanje izvede pred odstranitvijo živali iz preskusnega sistema. Dosedanje izkušnje s črnoglavim pisancem kažejo, da lahko nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem na začetku povzročijo spremembe naslednjih zunanjih značilnosti: barvo telesa (svetlo ali temno), vzorce obarvanja (prisotnost navpičnih prog) in obliko telesa (območje glave in prsi). Zato je treba opazovanje fizičnega videza rib izvesti med potekom preskusa in ob koncu študije.

Humano ubijanje rib

39. Na 21. dan, tj. ob prekinitvi izpostavljenosti, je treba ribe evtanazirati s primernimi količinami trikaina (trikain metan sulfonat, metakain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l, pufran s 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijev bikarbonat, CAS 144-55-8)), da se zmanjša draženje sluznice; kri ali tkivo se nato vzorči za določitev vitelogenina, kot je pojasnjeno v razdelku Vitelogenin.

▼M6

Opazovanje sekundarnih spolnih značilnosti

40. Nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem lahko povzročijo spremembe pri določenih sekundarnih spolnih značilnostih (število drstnih izpuščajev pri samcu črnoglavega pisanca in bradavičastih podaljškov pri samcu medake). Kemikalije z nekaterimi načini delovanja lahko povzročijo nenormalen pojav sekundarnih spolnih značilnosti pri živalih nasprotnega spola; agonisti androgenega receptorja, kot so trenbolon, metiltestosteron in dihidrotestosteron, lahko na primer pri samici črnoglavega pisanca povzročijo razvoj izrazitih drstnih izpuščajev ali pa pri samici medake razvoj bradavičastih podaljškov (11) (20) (21). Obstajajo tudi poročila, da lahko agonisti estrogenega receptorja zmanjšajo število drstnih izpuščajev in velikost dorzalne strani trupa pred hrbtno plavutjo pri odraslih samcih (25) (26). Taka splošna morfološka opažanja lahko zagotovijo koristne kvalitativne in kvantitativne informacije, ki kažejo mogoče zahteve za prihodnje preskušanje rib. Število in velikost drstnih izpuščajev pri črnoglavem pisancu in bradavičastih podaljškov pri medaki se lahko kvantificira neposredno ali bolj praktično z ohranjenimi vzorci. Priporočeni postopki za vrednotenje sekundarnih spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu in medaki so navedeni v Dodatku 5A oziroma Dodatku 5B.

Vitelogenin (VTG)

41. Kri se odvzame iz repne arterije/vene s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko ali namesto tega s srčno punkcijo z brizgo. Količine zbrane krvi so odvisne od velikosti ribe ter so običajno v razponu od 5 do 60 µl na posameznega črnoglavega pisanca in od 5 do 15 µl na posamezno cebrico. Plazma se od krvi loči s centrifugiranjem in shrani z inhibitorji protaze pri – 80 °C, dokler se ne analizira glede vitelogenina. Pri medaki pa se kot tkivni vir za določanje vitelogenina uporabijo jetra in pri cebrici homogenat glave/repa (Dodatek 6). Meritev VTG mora temeljiti na validirani homologni metodi ELISA, pri čemer se uporabijo homologni standard VTG in homologna protitelesa. Priporoča se uporaba metode, s katero je mogoče zaznati tako nizke ravni VTG, kot je nekaj ng/ml plazme (ali ng/mg tkiva), kar je raven naravnega ozadja pri neizpostavljenih ribjih samcih.

42. Nadzor kakovosti analize vitelogenina se zagotovi z uporabo standardov, slepih vzorcev in vsaj dvema analizama. Za vsako metodo ELISA je treba izvesti preskus vpliva matriksa (učinek razredčenja vzorca), da se določi najmanjši faktor razredčenja vzorca. Vsaka plošča ELISA, uporabljena za preskuse VTG, mora vsebovati naslednje vzorce za nadzor kakovosti: vsaj 6 kalibracijskih standardov, ki zajemajo razpon pričakovanih koncentracij vitelogenina, in vsaj en nespecifično vezalni preskus slepega vzorca (analiziran v dveh ponovitvah). Absorpcija teh slepih vzorcev mora biti manj kot 5 % največje absorpcije kalibracijskega standarda. Analizirana bosta vsaj dva alikvota (ponovitvi vdolbinic) posameznega razredčenja vzorca. Ponovitve vdolbinic, ki se razlikujejo za več kot 20 %, je treba ponovno analizirati.

43. Korelacijski koeficient (R^2) za umeritvene krivulje mora biti večji od 0,99. Vendar visoka korelacija ni dovolj za zagotovitev ustrezne napovedi koncentracije v vseh razponih. Poleg dovolj visoke korelacije za umeritveno krivuljo mora biti koncentracija posameznega standarda, kot je izračunana po umeritveni krivulji, med 70 in 120 % nominalne koncentracije. Če se

▼M6

nominalne koncentracije oddaljujejo od regresijske premice kalibracije (npr. pri nižjih koncentracijah), bo morda treba umeritveno krivuljo razdeliti na nizke in visoke razpone ali uporabiti nelinearen model, ki bo ustrezal podatkom o absorpciji. Če se krivulja razdeli, mora biti R^2 na obeh delih > 0,99.

44. Meja zaznavanja (LOD) je opredeljena kot koncentracija najnižjega analitskega standarda, meja določanja (LOQ) pa je opredeljena kot koncentracija najnižjega analitskega standarda, pomnoženega z najnižjim faktorjem razredčenja.

45. Vsak dan izvedbe preskusa vitelogenina se analizira obogateni vzorec, pripravljen z medpreskusnim referenčnim standardom (Dodatek 7). Razmerje med pričakovano koncentracijo in izmerjeno koncentracijo se sporoči skupaj z rezultati posameznih nizov preskusov, izvedenih isti dan.

PODATKI IN POROČANJE

Vrednotenje odziva biomarkerja z analizo variance (ANOVA)

46. Za določitev potencialnega endokrinega delovanja kemikalije se z analizo variance (ANOVA) primerjajo odzivi med tretiranji in kontrolnimi skupinami. Kadar se uporabi kontrola s topilom, je treba za vsako končno točko izvesti primeren statistični preskus med vodo za redčenje in kontrolami s topilom. Smernice za obravnavanje podatkov o vodi za redčenje in kontroli s topilom pri nadaljnji statistični analizi so navedene v OECD, 2006c (27). Vse podatke o biološkem odzivu je treba analizirati in sporočiti ločeno po spolu. Če niso izpolnjene zahtevane domneve za parametrske metode – nenormalna porazdelitev (npr. Shapiro-Wilkov preskus) ali heterogena varianca (Bartlettov ali Levenejev preskus), je potreben razmislek o preoblikovanju podatkov, da se poenotijo variance pred izvedbo ANOVA ali pred izvedbo tehtane ANOVA. Za nemonotoni odziv na odmerek se lahko uporabi Dunnettov preskus (parametrski) večkratnih primerjav med pari ali Mann-Whitneyjev preskus z Bonferroni-Holmovo prilagoditvijo (neparametrski). Če je odziv na odmerek približno monoton, se lahko uporabijo drugi statistični preskusi (npr. preskus po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov preskus). V pomoč pri odločitvi glede izbire najprimernejšega statističnega preskusa, ki naj se uporabi, je v Dodatku 8 zagotovljena statistična tabela poteka. Dodatne informacije so navedene v dokumentu OECD o sedanjih pristopih k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti (27).

Poročanje o rezultatih preskusa

47. Podatki študije morajo obsegati:

Preskusna infrastruktura:

— odgovorno osebje in njihove obveznosti v zvezi s študijo,

— vsak laboratorij mora s sklopom reprezentativnih kemikalij dokazati usposobljenost.

Preskusna kemikalija:

— opredelitev preskusne kemikalije,

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

▼**M6**

— metodo in pogostost priprave preskusnih koncentracij,

— informacije o stabilnosti in biološki razgradljivosti.

Topilo:

— opredelitev topila (vrsta, uporabljena koncentracija),

— utemeljitev izbire topila (če to ni voda).

Preskusne živali:

— vrsto in sev,

— dobavitelja in specifično infrastrukturo dobavitelja,

— starost rib na začetku preskusa in razmnoževalno stanje/stanje drstenja,

— podrobnosti o postopku aklimatizacije živali,

— telesno težo rib na začetku izpostavljenosti (iz podvzorca staleža rib).

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (vrsta preskusa, stopnja obremenitve, gostota rib itd.),

— metodo priprave založnih raztopin in pretok,

— nominalne preskusne koncentracije, tedensko izmerjene koncentracije preskusnih raztopin in uporabljeno analitsko metodo, sredine izmerjenih vrednosti in standardnih odklonov v preskusnih posodah ter dokaze, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini,

— značilnosti vode za redčenje (vključno s pH, trdoto, alkalnostjo, temperaturo, koncentracijo raztopljenega kisika, koncentracijo sledi klora, skupnim organskim ogljikom, suspendiranimi trdnimi snovmi in vsemi ostalimi opravljenimi meritvami),

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika,

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost dajanja ter analiza zadevnih onesnaževal, če je na voljo (npr. PCB, PAH in organoklorni pesticidi).

Rezultati

— dokaze, da kontrole izpolnjujejo merila za sprejemljivost preskusa,

— podatke o smrtnosti za posamezne preskusne koncentracije in kontrole,

— uporabljene tehnike statistične analize, obdelavo podatkov in utemeljitev uporabljenih tehnik,

— podatke o bioloških opažanjih splošne morfologije, vključno s sekundarnimi spolnimi značilnostmi in vitelogeninom,

▼M6

— rezultate analize podatkov, po možnosti v obliki tabele in grafičnega prikaza,

— pojav kakršnih koli neobičajnih reakcij rib in kakršnih koli vidnih učinkov, ki jih povzroči preskusna kemikalija.

SMERNICA ZA RAZLAGO IN SPREJEMLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

48. V tem razdelku je navedenih nekaj pomislekov, ki jih je treba upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa za različne izmerjene končne točke. Rezultate je treba previdno razlagati, kadar se zdi, da preskusna kemikalija povzroča očitno strupenost ali vpliva na splošno stanje preskusne živali.

49. Pri določanju razpona preskusnih koncentracij je treba paziti, da se ne preseže najvišja tolerančna koncentracija, da bo mogoča smiselna razlaga podatkov. Kadar ni znakov strupenih učinkov, je pomembno, da se izvede vsaj eno tretiranje. Znake bolezni in znake strupenih učinkov je treba temeljito oceniti in o njih poročati. Možno je na primer, da na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna strupenost in neendokrini strupeni načini delovanja, npr. hepatotoksičnost. Vendar se lahko razlaga učinkov podkrepi z drugimi stopnjami tretiranja, na katere ne vpliva sistemska strupenost.

50. V zvezi s sprejemljivostjo rezultatov preskusa je treba upoštevati nekaj vidikov. Ravni VTG v kontrolnih skupinah samcev in samic morajo biti kot smernica izrazite ter ločene za približno tri rede velikosti pri črnoglavem pisancu in cebrici ter približno en red velikosti pri medaki. Primeri razpona vrednosti v kontrolnih in tretiranih skupinah so navedene v validacijskih poročilih (1) (2) (3) (4). Visoke vrednosti VTG pri samcih iz kontrol bi lahko ogrozile odzivnost preskusa in njegovo zmožnost za zaznavanje šibkih agonistov estrogena. Nizke vrednosti VTG pri samicah iz kontrol bi lahko ogrozile odzivnost preskusa ter njegovo zmožnost za zaznavanje inhibitorjev aromataze in antagonistov estrogena. Pri pripravi te smernice so bile uporabljene validacijske študije.

51. Če laboratorij še ni izvedel preskusa ali je prišlo do znatnih sprememb (npr. sprememba seva ali dobavitelja rib), se priporoča izvedba študije tehnične usposobljenosti. Priporočljivo je, da se uporabijo kemikalije, ki zajemajo različne načine delovanja ali vplive na številne preskusne končne točke. V praksi se vsak laboratorij spodbuja k vzpostavitvi lastnih podatkov o kontroli iz preteklih preskusov za samce in samice ter izvedbi pozitivne kontrole za estrogeno delovanje (npr. 17β-estradiol pri100 ng/l ali znan šibek agonist), ki povzroči povečanje VTG pri ribjih samcih, pozitivne kontrole za zaviranje aromataze (npr. fadrozol ali prokloraz pri 300 μg/l), ki povzroči zmanjšanje VTG pri ribjih samicah, in pozitivno kontrolo za androgeno delovanje (npr. 17β-trenbolon pri 5 μg/l), ki povzroči indukcijo sekundarnih spolnih značilnosti pri samicah črnoglavega pisanca in medake. Vsi ti podatki se lahko primerjajo z razpoložljivimi podatki iz validacijskih študij (1) (2) (3), da se zagotovi usposobljenost laboratorija.

52. Na splošno je treba meritve vitelogenina šteti za pozitivne, če se VTG pri samcih statistično značilno poveča ($p < 0,05$) ali pri samicah statistično značilno zmanjša ($p < 0,05$) vsaj pri najvišjem preskušenem odmerku v primerjavi s kontrolno skupino ter ob odsotnosti znakov splošne strupenosti. Pozitiven rezultat je nadalje podprt s prikazom biološko verjetnega razmerja med odmerkom in krivuljo odziva. Kot je bilo navedeno, zmanjšanje vitelogenina morda ni v celoti endokrinega izvora; vendar je treba pozitiven rezultat na splošno razlagati kot dokaz endokrinega delovanja *in vivo* ter si prizadevati za nadaljnjo pojasnitev.

▼**M6**

LITERATURA

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens, J. W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (dostop 18.9.2008).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 str.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter in Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7: 173–8 Review.

(8) Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J. A., Tyler, C. R., Braunbeck, T. (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3): 277–91.

(9) Andersen, L., Goto-Kazato, R., Trant, J. M., Nash, J. P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3–4): 343–52.

(10) Ankley, G. T., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hornung, M. W., Korte, J. J., Makynen, E. A., Leino, R. L. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences; 67(1): 121–30.

(11) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Hurd, K. S., Sherren, A., Stanley, R. D., Tyler, C. R. (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1): 11–21.

(12) Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A., Sullivan, C. V. (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2): 113–25.

▼**M6**

(13) Panter, G. H., Tyler, C. R., Maddix, S., Campbell, P. M., Hutchinson, T. H., Länge, R., Lye, C., Sumpter, J. P., 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruselj, Belgija.

(14) Fenske, M., van Aerle, R. B., Brack, S. C., Tyler, C. R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217–232.

(15) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard B., Pedersen, K. L., Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119–131.

(16) Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Noerum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531–539.

(17) Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A., Porcher, J. M., Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699– 1708.

(18) Yokota, H., Morita, H., Nakano, N., Kang, I. J., Tadokoro, H., Oshima, Y., Honjo, T., Kobayashi, K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., in Iguchi, T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301–308.

(20) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Homung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Gray, L. E. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350–60.

(21) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K. (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3): 774–81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Pariz.

(23) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D. B., 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; str. 69–92.

(24) Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H., Tyler, C. R., 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1: 106– 14.

(25) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129– 145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L. S. Blake, E. J. Durhan, K. J. Greene, M. D. Kahl, K. M. Jensen, E. A. Makynen, D. L. Villeneuve in G. T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478–488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18.

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

▼**M6**

Dodatek 1

Okrajšave in opredelitev pojmov

Kemikalija: snov ali zmes.

KV: koeficient variacije.

ELISA: encimski imunski test.

Stopnja obremenitve: mokra teža rib na količino vode.

Gostota rib: število rib na količino vode.

VTG (vitelogenin): fosfoglikoprotein in predstopnja rumenjakovih beljakovin, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

Os HPG: os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze.

MTC: najvišja tolerančna koncentracija, ki predstavlja približno 10 % LC_{50}.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

▼M6

Dodatek 2

Poskusni pogoji za endokrini presejalni preskus rib

1. Priporočene vrste	**Črnoglavi pisanec** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Cebrica** (*Danio rerio*)
2. Vrsta preskusa	pretočni	pretočni	pretočni
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kakovost osvetljenosti	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)
5. Jakost svetlobe	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)
6. Obdobje osvetljenosti (svitanje in mrak sta neobvezna, vendar se ne štejeta za potrebna)	16 ur svetlobe, 8 ur teme	12–16 ur svetlobe, 12-8 ur teme	12–16 ur svetlobe, 12-8 ur teme
7. Stopnja obremenitve	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Velikost preskusne komore	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Količina preskusne raztopine	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Zamenjave količin preskusnih raztopin	vsaj 6 na dan	vsaj 5 na dan	vsaj 5 na dan
11. Starost preskusnih organizmov	glej odstavek 20	glej odstavek 20	glej odstavek 20
12. Približna mokra teža odrasle ribe (g)	samice: 1,5 ± 20 % samci: 2,5 ± 20 %	samice: 0,35 ± 20 % samci: 0,35 ± 20 %	samice: 0,65 ± 20 % samci: 0,4 ± 20 %
13. Št. rib na preskusno posodo	6 (2 samca in 4 samice)	10 (5 samcev in 5 samic)	10 (5 samcev in 5 samic)
14. Št. tretiranj	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)
15. Št. posod na tretiranje	najmanj 4	najmanj 2	najmanj 2
16. Št. rib na preskusno koncentracijo	16 odraslih samic in 8 samcev (4 samice in 2 samca v vsaki ponovitveni posodi)	10 odraslih samic in 10 samcev (5 samic in 5 samcev v vsaki ponovitveni posodi)	10 odraslih samic in 10 samcev (5 samic in 5 samcev v vsaki ponovitveni posodi)
17. Način hranjenja	živi ali zamrznjeni odrasli solinski rakci ali njihovi navpliji dvakrat ali trikrat na dan (*ad libitum*), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega	navpliji solinskih rakcev dvakrat ali trikrat na dan (*ad libitum*), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega	navpliji solinskih rakcev dvakrat ali trikrat na dan (*ad libitum*), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega

▼**M6**

18. Prezračevanje	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti
19. Voda za redčenje	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda
20. Obdobje predhodne izpostavljenosti	priporočeno 7 dni	priporočeno 7 dni	priporočeno 7 dni
21. Trajanje izpostavljenosti kemikaliji	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biološke končne točke	preživetje obnašanje 2y spolne značilnosti VTG	preživetje obnašanje 2y spolne značilnosti VTG	preživetje obnašanje VTG
23. Sprejemljivost preskusa	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja temperatura 25 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v razponu 20 % srednjih izmerjenih vrednosti na stopnjo tretiranja	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja temperatura 24 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v razponu 20 % srednjih izmerjenih vrednosti na stopnjo tretiranja	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja temperatura 26 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v razponu 20 % srednjih izmerjenih vrednosti na stopnjo tretiranja

▼**M6**

Dodatek 3

Nekatere kemične značilnosti sprejemljive vode za redčenje

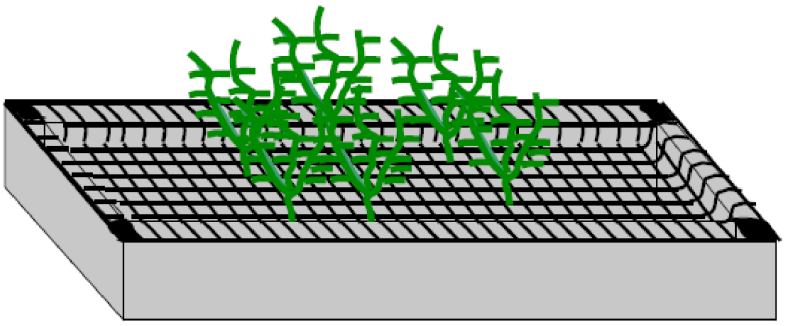
Sestavina	Koncentracije
delci	< 20 mg/l
skupni organski ogljik	< 2 mg/l
neionizirani amoniak	< 1 µg/l
ostanek klora	< 10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l

▼M6

Dodatek 4A

Substrat za drstenje cebrice

Drstilni pladenj: popolnoma steklena laboratorijska posoda, na primer 22 × 15 × 5,5 cm (d × š × g), pokrita z odstranljivo rešetko iz nerjavnega jekla (širina mreže 2 mm). Rešetka mora prekriti odprtino laboratorijske posode pod robom.



Na rešetko je treba pritrditi substrat za drstenje. Zagotoviti mora strukturo, v katero se premaknejo ribe. Primerne so na primer umetne akvarijske rastline iz zelene plastike (opomba: proučiti je treba morebitno adsorpcijo preskusne kemikalije na plastični material). Plastični material je treba dovolj dolgo izpirati v zadostni količini tople vode za zagotovitev, da v preskusno vodo ne bo prešla nobena kemikalija. Pri uporabi steklenih materialov je treba zagotoviti, da se ribe med intenzivnim premikanjem ne poškodujejo niti niso utesnjene.

Razdalja med pladnjem in steklenimi ploščami mora biti vsaj 3 cm, da bi bilo zagotovljeno, da se ribe ne drstijo zunaj pladnja. Ikre, odložene na pladenj, padejo skozi rešetko in se lahko vzorčijo 45–60 minut po začetku osvetljenosti. Prozorne ikre niso sprijete in se lahko enostavno štejejo z uporabo prečne svetlobe. Če je v posodi pet samic, se do 20 iker na dan lahko šteje za nizko število, do 100 iker kot srednje in več kot 100 iker kot visoko število. Drstilni pladenj je treba odstraniti, zbrati ikre in drstilni pladenj ponovno postaviti v preskusno posodo čim pozneje zvečer ali zelo zgodaj zjutraj. Čas do ponovne postavitve rešetke ne sme presegati eno uro, saj bi sicer lahko substrat za drstenje vodil do posameznih parjenj in drstenj ob neobičajnem času. Če je treba zaradi razmer drstilni pladenj vstaviti pozneje, je treba to storiti vsaj 9 ur po začetku osvetljenosti. Drstenje se tako pozno ne začne več.

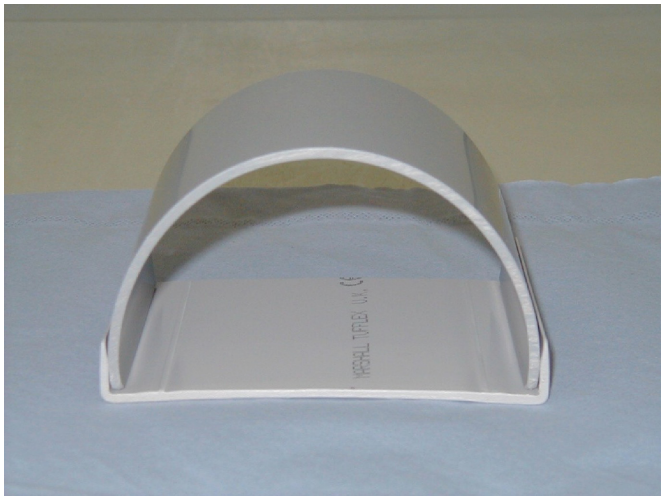
▼**M6**

Dodatek 4B

Substrat za drstenje črnoglavega pisanca

V vsako preskusno komoro se postavijo dve ali tri kombinirane plastične/keramične/steklene plošče ali plošče iz nerjavnega jekla in drstilni pladnji (npr. 80 mm dolg siv polkrožen žleb na pladenj z robovi, dolg 130 mm) (glej sliko). Ustrezno pripravljene plošče iz PVC ali keramike so dokazano primerne za substrat za drstenje (Thorpe idr., 2007).

Priporočeno je, da so plošče pobrušene, da se izboljša oprijem. Pladenj mora biti tudi zaščiten, da se ribam prepreči dostop do iker, ki padejo skozi, razen če je bil za uporabljen substrat za drstenje dokazan učinkovit oprijem.



Podlaga je zasnovana tako, da zadrži vse ikre, ki se ne primejo površine plošče in bi zato padle na dno posode (ali tiste ikre, ki so odložene neposredno na ravno plastično podlago). Vse substrate za drstenje je treba pred uporabo izpirati v vodi za redčenje vsaj 12 ur.

VIRI

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T. H., Tyler, C. R., 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

Dodatek 5A

Ocena sekundarnih spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu za zaznavanje nekaterih kemikalij z endokrinim delovanjem

Pregled

Potencialno pomembne značilnosti fizičnega videza odraslih črnoglavih pisancev pri preskušanju povzročiteljev endokrinih motenj vključujejo barvo telesa (tj. svetlo/temno), vzorce obarvanja (tj. prisotnost navpičnih prog), obliko telesa (tj. oblika glave in območja prsi, napetost trebuha) in posebne sekundarne spolne značilnosti (tj. število in velikost drstnih izpuščajev, velikost dorzalne strani trupa pred hrbtno plavutjo in leglica).

Drstni izpuščaji so na glavi (dorzalna stran trupa pred hrbtno plavutjo) razmnoževalno aktivnih samcev črnoglavega pisanca in so običajno razporejeni v dvostransko simetrični vzorec (Jensen idr., 2001). Pri kontrolnih samicah ter mladih samcih in samicah razvoj izpuščajev ni viden (Jensen idr., 2001). Okoli oči in med nosnicama samcev je lahko do osem posameznih izpuščajev. Največ izpuščajev in največji izpuščaji se nahajajo v dveh vzporednih linijah neposredno pod nosnicama in nad usti. Pri veliko ribah so skupine izpuščajev pod spodnjo čeljustjo; izpuščaji, ki so najbliže ustom, se običajno pojavljajo kot par, medtem ko lahko bolj ventralen sklop sestavljajo največ štirje izpuščaji. Dejansko število izpuščajev je redko večje od 30 (razpon 18–28; Jensen idr., 2001). Prevladujoči izpuščaji (v smislu števila) so prisotni kot posamezne, razmeroma okrogle strukture, katerih višina je približno enaka polmeru. Večina razmnoževalno aktivnih samcev ima tudi vsaj nekaj izpuščajev, ki so večji in izraziti, da jih ni mogoče razlikovati kot posamezne strukture.

Nekatere vrste kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje, lahko povzročijo nenormalen pojav nekaterih sekundarnih spolnih značilnosti pri nasprotnem spolu; agonisti androgenih receptorjev, kot je 17β-metiltestosteron ali 17β-trenbolon, lahko pri samicah črnoglavega pisanca povzročijo razvoj drstnih izpuščajev (Smith 1974; Ankley idr., 2001; 2003), medtem ko lahko agonisti estrogenih receptorjev zmanjšajo število ali velikost drstnih izpuščajev pri samcih (Miles-Richardson idr. 1999; Harries idr. 2000).

V nadaljevanju je naveden opis opredelitve drstnih izpuščajev pri črnoglavem pisancu na podlagi postopkov, uporabljenih v laboratoriju Agencije za varstvo okolja ZDA (U. S. Environmental Protection Agency) v Duluthu, Minnesota. Specifični izdelki in/ali oprema se lahko nadomestijo s primerljivimi materiali, ki so na voljo.

Opazovanje je najboljše z uporabo osvetljenega povečevalnega stekla ali trikratno osvetljenega stereomikroskopa. Ribe se opazujejo dorzalno in anteriorno naprej (glava proti opazovalcu).

(a) Ribe se postavijo v majhno petrijevko (npr. s premerom 100 mm) anteriorno naprej in ventralno navzdol. Iskalo se usmeri tako, da se omogoči identifikacija izpuščajev. Za identifikacijo območij z izpuščaji se riba nežno in počasi obrne z ene strani na drugo. Izpuščaji se preštejejo in ocenijo.

(b) Opazovanje se ponovi na ventralni površini glave, tako da se riba v petrijevko postavi dorzalno anteriorno naprej.

(c) Opazovanje posamezne ribe je treba zaključiti v 2 minutah.

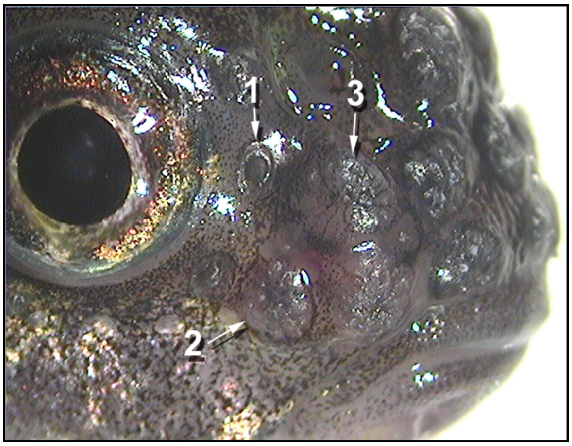
▼M6

Štetje in ocenjevanje izpuščajev

Za ocenjevanje prisotnosti in razvoja izpuščajev pri odraslih črnoglavih pisancih je bilo identificiranih šest posebnih območij. Za določitev lokacije in količine prisotnih izpuščajev je bila pripravljena predloga (glej konec tega Dodatka). Število izpuščajev se zabeleži, njihova velikost pa se lahko za vsak organizem kvantitativno razvrsti kot sledi: 0 – odsoten, 1 – prisoten, 2 – povečan in 3 – izrazit (slika 1).

Ocena 0 – odsotnost izpuščajev. Ocena 1 – prisoten, ta ocena se opredeli kot vsak izpuščaj z eno točko, v kateri je višina skoraj enaka polmeru (premeru). Ocena 2 – povečan, ta ocena se opredeli s tkivom, ki je po videzu podobno zvezdici in ima običajno veliko zvezdasto osnovo z brazdami ali gubami, ki izhajajo in središča. Izpuščaj je v višino pogosto bolj žagast, vendar je lahko občasno nekoliko zaokrožen. Ocena 3 – izrazit, ta ocena običajno pomeni razmeroma velik in zaokrožen izpuščaj z manj definirano strukturo. Ti izpuščaji se občasno nahajajo skupaj in tvorijo eno maso skupaj s posameznimi območji (B, C in D, opisana v nadaljevanju) ali njihovo kombinacijo. Obarvanost in oblika sta podobna oceni 2, vendar sta občasno razmeroma neselektivna. S tem ocenjevalnim sistemom je skupna ocena izpuščajev običajno < 50 pri normalnih kontrolnih samcih s številom izpuščajev od 18 do 20 (Jensen idr., 2001).

Slika 1



Dejansko število izpuščajev pri nekaterih ribah je lahko večje od polj v predlogi (Dodatek A) za določeno območje ocenjevanja. V tem primeru se lahko označijo dodatne ocene, in sicer desno ali levo od polja. Zato ni treba, da je predloga simetrična. Dodatna tehnika označevanja izpuščajev, ki so v parih ali združeni navpično ob vodoravni ravnini ust, se lahko izvede z označevanjem dveh ocen izpuščajev v enem polju.

Območja označevanja:

A – izpuščaji okoli oči. Označeni dorzalno do ventralno okoli anteriornega očesnega obroča. Pri odraslih kontrolnih samcih jih je pogosto več, pri kontrolnih samicah jih ni, na splošno so v parih (en blizu vsakega očesa) ali sami pri samicah, izpostavljenih androgenom.

B – izpuščaji med nosnicama (pore senzornega kanala). Pri kontrolnih samcih so običajno v parih in v razvitejših fazah (2 – povečani ali 3 – izraziti). Niso prisotni pri kontrolnih samicah, pri čemer se pojavljajo in razvijajo pri samicah, izpostavljenih androgenom.

C – izpuščaji neposredno anteriorno na nosni odprtini, vzporedno z usti. Pri odraslih kontrolnih samcih so običajno povečani ali izraziti. Pri manj razvitih samcih ali samicah, tretiranih z androgenom, so prisotni ali povečani.

▼**M6**

D – izpuščaji vzporedno z ustno linijo. Pri kontrolnih samcih so običajno ocenjeni kot razviti. Pri kontrolnih samicah niso prisotni, vendar so prisotni pri samicah, izpostavljenih androgenom.

E – izpuščaji na spodnji čeljusti, blizu ust, so običajno majhni in pogosto v parih. Pri kontrolnih ali tretiranih samcih in tretiranih samicah se razlikujejo.

F – izpuščaji ventralno na E. Pogosto so majhni in v parih. Prisotni so pri kontrolnih samcih in samicah, izpostavljenih androgenom.

VIRI

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas)*. *Environ Toxicol Chem* 20: 1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Gray, E. L. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22: 1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34: 3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., Ankley, G. T. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128: 127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., Ankley, G. T. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59: 515–523.

(6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47: 129–145.

(7) Smith, R. J. F. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52: 1031–1038.

Predloga za izpuščaje	**Številska ocena**
ID _____	1 – prisoten
Datum _____	2 – povečan
Skupna ocena _____	3 – izrazit

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
				F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**			

▼M6

Dodatek 5B

Ocena sekundarnih spolnih značilnosti pri medaki za zaznavanje nekaterih kemikalij z endokrinim delovanjem

V nadaljevanju je naveden opis bradavičastih podaljškov (*), ki so sekundarna spolna značilnost pri medaki (*Oryzias latipes*).

(*) Bradavičasti podaljški se običajno pojavijo le pri odraslih samcih na plavutnicah, in sicer od druge do sedme ali osme s posteriornega konca predrepne plavuti (sliki 1 in 2). Vendar se podaljški redko pojavijo na prvi plavutnici s posteriornega konca predrepne plavuti. Ta standardni delovni postopek zajema meritev podaljškov na prvi plavutnici (v tem standardnem delovnem postopku se številka plavutnice nanaša na zaporedje od posteriornega konca predrepne plavuti).

(1) Po odstranitvi jeter (Dodatek 6) se telo postavi v koničasto epruveto, ki vsebuje približno 10 ml 10-odstotnega nevtralno pufranega formalina (glava navzgor in rep navzdol). Če so spolne žleze fiksirane v raztopini, ki ni 10-odstotni nevtralno pufran formalin, se z rezilom naredi prečni rez čez telo med anteriornim območjem predrepne plavuti in anusom, pri čemer je treba paziti, da se ne poškodujejo gonopora in same spolne žleze (slika 3). Kranialna stran telesa ribe se vstavi v raztopino fiksativa, da se ohranijo spolne žleze, repna stran telesa ribe pa se vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin, kot je opisano zgoraj.

(2) Ko se telo ribe vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin, se anteriorno območje predrepne plavuti prime s pinceto in za približno 30 sekund prepogne, da je predrepna plavut odprta. Pri prijemu predrepne plavuti s pinceto se nekaj plavutnic v anteriornem območju previdno prime, da se bradavičasti podaljški ne opraskajo.

(3) Ko je predrepna plavut približno 30 sekund odprta, se telo ribe shrani v 10-odstotnem nevtralno pufranem formalinu pri sobni temperaturi do meritve bradavičastih podaljškov (meritev je treba izvesti po vsaj 24-urni fiksaciji).

Merjenje

(1) Po vsaj 24-urni fiksaciji telesa ribe v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu se telo ribe vzame iz koničaste epruvete in formalin obriše s filtrirnim papirjem (ali papirnato brisačo).

(2) Riba se obrne s trebušno stranjo navzgor. Nato se predrepna plavut previdno odreže z majhnimi secirnimi škarjami (predrepna plavut se po možnosti odreže z nekaj radiji (pterygiophore).

(3) Anteriorni del odrezane predrepne plavuti se prime s pinceto in položi na objektno stekelce z nekaj kapljicami vode. Nato se predrepna plavut prekrije s krovnim stekelcem. Med prijemanjem predrepne plavuti s pinceto je treba paziti, da se bradavičasti podaljški ne opraskajo.

(4) S števcem se pod biološkim mikroskopom (pokončni mikroskop ali obrnjeni mikroskop) prešteje število ploščic z bradavičastimi podaljški. Bradavičasti podaljški se prepoznajo, če je na posteriornem robu ploščice vidna majhna

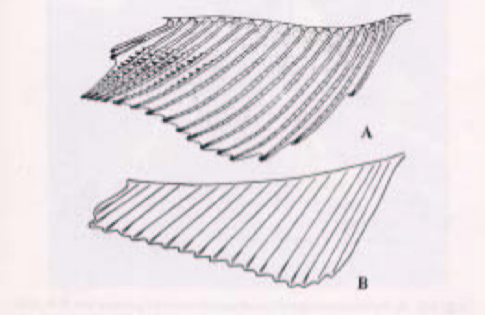
▼M6

tvorba podaljškov. Na delovni list se zapiše število ploščic z bradavičastimi podaljški na vsaki plavutnici (npr. prva plavutnica: 0, druga plavutnica: 10, tretja plavutnica: 12 itd.), vsota teh števil po posameznih ribah pa se vnese v Excelovo preglednico. Po potrebi se predrepna plavut fotografira in na fotografiji prešteje število ploščic z bradavičastimi podaljški.

(5) Po meritvi se predrepna plavut vstavi v koničasto epruveto, opisano v (1), in shrani.

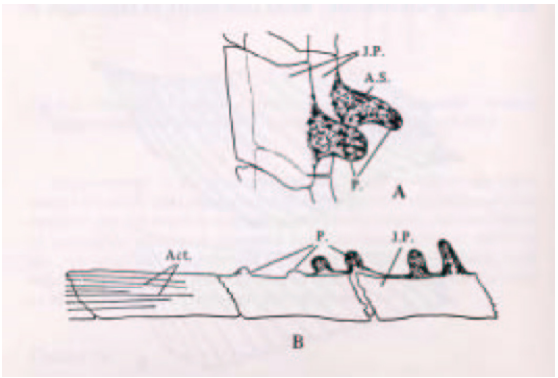
Slika 1

Diagram, na katerem so prikazane razlike v obliki in velikosti predrepne plavuti glede na spol. A, samec; B, samica. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



Slika 2

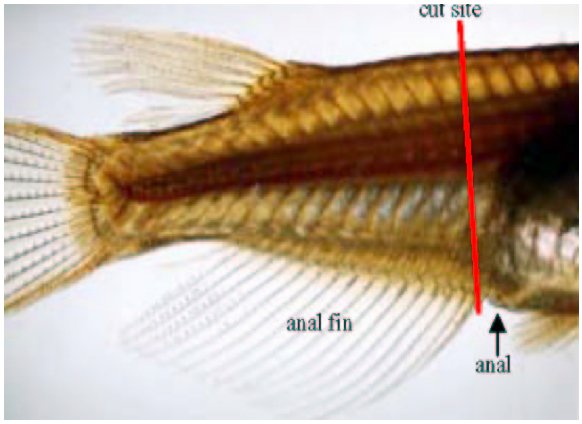
A, podaljški na ploščicah predrepne plavutnice. J.P., ploščica; A.S., aksialni prostor; P., proces. B, distalna okončina plavutnice. *Actinotrichia* (*Act.*) so na vrhu. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



▼**M6**

Slika 3

Fotografija telesa ribe, na kateri je prikazana stran reza, če so spolne žleze fiksirane v raztopini za fiksiranje, ki ni 10-odstotni nevtralno pufran formalin. V tem primeru se preostalo telo z rezilom (rdeča) prereže med anteriornim delom predrepne plavuti in anusom, sprednji del ribe se vstavi v raztopino za fiksiranje spolnih žlez, zadnji del ribe pa se vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin.



▼M6

Dodatek 6

Priporočeni postopki odvzema vzorcev za analizo vitelogenina

Preprečiti je treba navzkrižno onesnaženje med vzorci VTG samcev in samic.

Postopek 1A: Črnoglavi pisanec, odvzem krvi iz repne vene/arterije

Po anesteziji se repno steblo delno prereže z rezilom skalpela, pri čemer se kri odvzame iz repne vene/arterije s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko. Ko je kri odvzeta, se plazma hitro izolira s 3-minutnim centrifugiranjem pri 15 000 g (ali namesto tega 10 minut pri 15 000 g in 4 °C). Po želji se lahko po centrifugiranju določi odstotek hematokrita. Delež plazme se nato odstrani iz mikrohematokritske cevke in shrani v centrifugirki z 0,13 enotami aprotinina (inhibitor protaze) pri – 80 °C, dokler ni mogoče določiti vitelogenina. Odvzete količine plazme so običajno od 5 do 60 mikrolitrov na ribo, odvisno od velikost črnoglavega pisanca (ki je odvisna od spola) (Jensen idr., 2001).

Postopek 1B: Črnoglavi pisanec, odvzem krvi iz srca

Namesto tega se lahko kri odvzame tudi s srčno punkcijo s heparinizirano brizgo (1 000 enot heparina na ml). Kri se prenese v mikroepruvete (shranjene na ledu) in nato centrifugira (5 minut, 7 000 g, sobna temperatura). Plazmo je treba prenesti v čiste mikroepruvete (v alikvotih, če količina plazme to omogoča) in takoj zamrzniti pri – 80 °C, dokler se ne analizira (Panter idr., 1998).

Postopek 2A: Japonska medaka, odstranitev jeter pri medaki

Odstranitev preskusne ribe iz preskusne komore

(1) Preskusno ribo je treba iz preskusne komore odstraniti z lovilno mrežico. Paziti je treba, da preskusna riba ne pade v druge preskusne komore.

(2) Načeloma je treba preskusne ribe odstraniti po naslednjem vrstnem redu: kontrola, kontrola s topilom (če je primerno), najnižja koncentracija, srednja koncentracija, najvišja koncentracija in pozitivna kontrola. Poleg tega je treba odstraniti vse samce iz ene preskusne komore, preden se odstranijo preostale samice.

(3) Spol posamezne preskusne ribe se določi na podlagi zunanjih spolnih značilnosti (npr. oblike predrepne plavuti).

(4) Preskusna riba se vstavi v posodo za prenos in prenese na delovno postajo za odstranitev jeter. Preveri se, ali so oznake preskusne komore in posode za prenos točne ter potrdi, da sta število rib, ki so bile odstranjene iz preskusne komore, in število rib, ki ostanejo v preskusni komori, skladni s pričakovanji.

(5) Če spola ni mogoče določiti na podlagi zunanjega videza rib, se odstranijo vse ribe iz preskusne komore. V tem primeru je treba spol določiti z opazovanjem spolnih žlez ali sekundarnih spolnih značilnosti pod stereomikroskopom.

▼**M6**

Odstranitev jeter

(1) Preskusna riba se iz posode za prenos prenese v raztopino za anestezijo z lovilno mrežico.

(2) Ko je preskusna riba anestezirana, se prenese na filtrirni papir (ali papirnato brisačo) s pinceto (za splošno rabo). S pinceto se prime glava preskusne ribe, da se prepreči poškodba repa.

(3) S površine preskusne ribe na filtrirnem papirju (ali papirnati brisači) se obriše voda.

(4) Riba se obrne s trebušno stranjo navzgor. Nato se z majhnimi secirnimi škarjami naredi majhen prečni rez na sredini med ventralnim delom vratu in srednjim trebušnim delom.

(5) V majhen rez se vstavijo secirne škarje, s katerimi se zareže v trebuh od točke pod škržnim plaščem do kranialne strani anusa po sredini trebuha. Paziti je treba, da se secirne škarje ne vstavijo preglobоko, s čimer se prepreči poškodba jeter in spolnih žlez.

(6) Pod stereomikroskopom se izvedejo naslednji postopki.

(7) Preskusna riba se s trebušno stranjo navzgor postavi na papirnato brisačo (na voljo je tudi petrijevka ali objektno stekelce).

(8) Stene trebušne votline se razprejo z natančno pinceto, notranji organi pa se eksteriorizirajo. Po potrebi je sprejemljiva tudi eksteriorizacija notranjih organov z odstranitvijo ene strani stene trebušne votline.

(9) Z drugo natančno pinceto se izpostavijo jetra in žolčnik. Nato se prime žolčni vod in odreže žolčnik. Paziti je treba, da se žolčnik ne poškoduje.

(10) Na enak način se prime požiralnik in odstrani prebavni trakt. Paziti je treba, da iz prebavnega trakta ne uide vsebina. Odstranita se repni prebavni trakt iz anusa in trakt iz trebušne votline.

(11) Z obrobja jeter se odrežeta masa maščobe in drugo tkivo. Paziti je treba, da se jetra ne opraskajo.

(12) Z natančno pinceto se prime jetrno portalno polje, jetra pa se odstranijo iz trebušne votline.

(13) Jetra se položijo na objektno stekelce. Po potrebi se s površine jeter z natančno pinceto odstranita vsa dodatna maščoba in nepomembno tkivo (npr. notranja plast trebušne votline).

(14) Teža jeter se izmeri s tarirano 1,5-mililitrsko mikroepruveto z uporabo elektronske analitske tehtnice. Vrednost se zabeleži na delovnem listu (odčitek: 0,1 mg). Potrdijo se identifikacijski podatki na nalepki mikroepruvete.

(15) Pokrov mikroepruvete z jetri se zapre. Shrani se na rešetki za hlajenje (ali rešetki za zamrzovanje).

(16) Po odstranitvi enih jeter se instrumenti za seciranje očistijo ali nadomestijo s čistimi.

▼M6

(17) Jetra se iz vseh rib v posodi za prenos odstranijo, kot je opisano zgoraj.

(18) Ko se odstranijo jetra iz vseh rib v posodi za prenos (tj. vseh samcev ali samic v preskusni komori), se vsi vzorci jeter postavijo na rešetko za epruvete z identifikacijsko nalepko in shranijo v zamrzovalniku. Če se jetra donirajo za predhodno tretiranje kmalu po odstranitvi, se vzorci prenesejo na naslednjo delovno postajo na rešetki za hlajenje (ali rešetki za zamrzovanje).

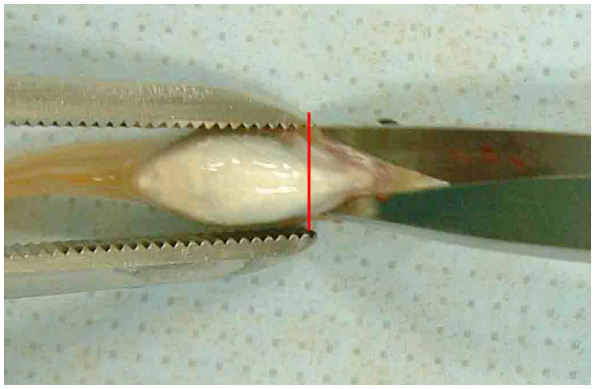
Po odstranitvi jeter je telo ribe na voljo za meritev sekundarnih spolnih značilnosti.

Vzorec

Vzorci jeter, odvzeti pri preskusnih ribah, se shranijo pri ≤ –70 °C, če se ne uporabijo za predhodno tretiranje kmalu po odstranitvi.

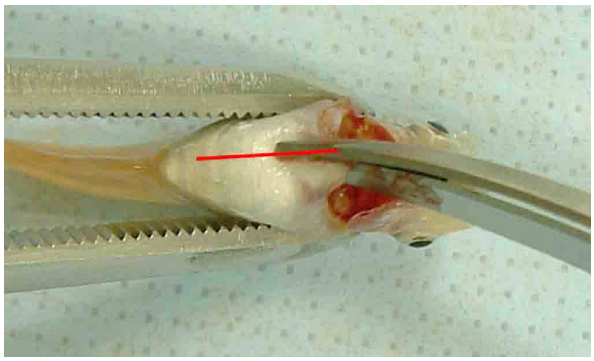
Slika 1

Rez se s škarjami naredi neposredno anteriorno na prsno plavut.



Slika 2

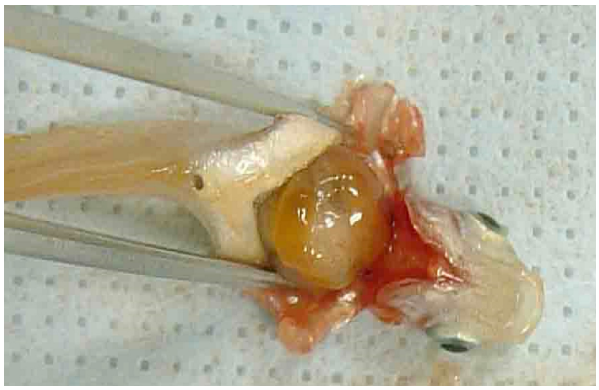
V srednjo črto trebuha se s škarjami zareže do točke, ki se nahaja približno 2 mm kranialno na anus.



▼M6

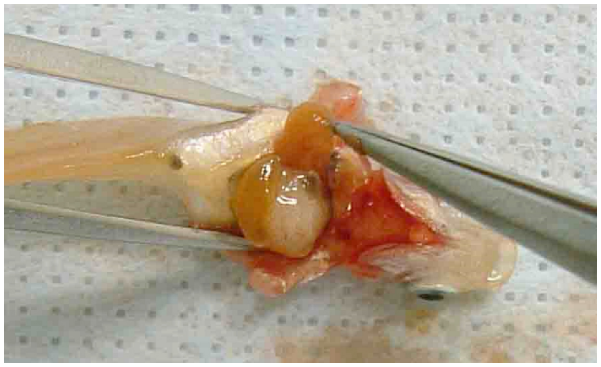
Slika 3

Trebušne stene se razširijo s prijemalkami, da se izpostavijo jetra in drugi notranji organi. (Namesto tega se lahko trebušne stene pripnejo s strani.)



Slika 4

Jetra se neposredno secirajo in odstranijo s prijemalkami.



Slika 5

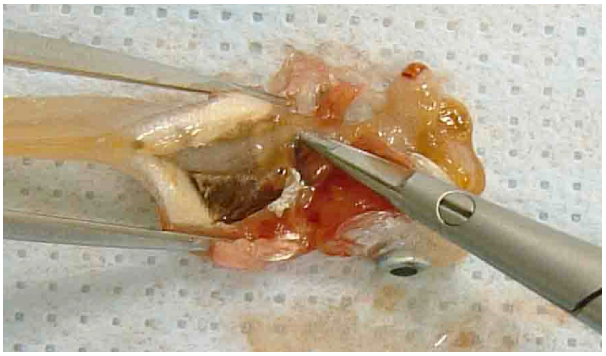
Črevesje se s prijemalkami nežno umakne.



▼M6

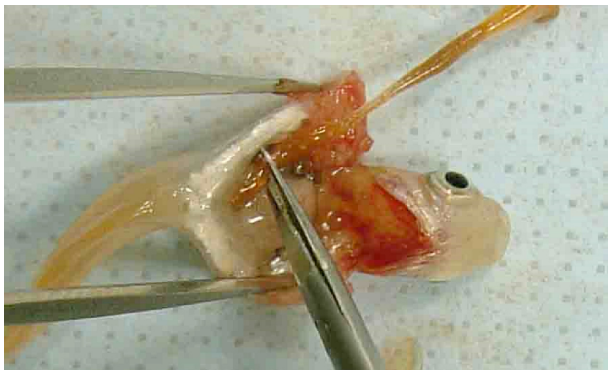
Slika 6

Oba konca črevesja in vse pritrditve mezenterija se odrežejo s škarjami.



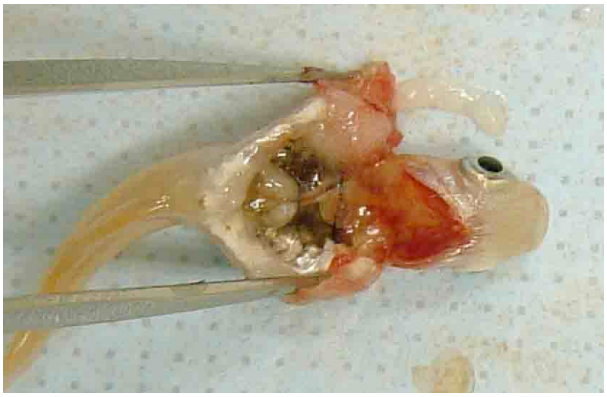
Slika 7 (samica)

Postopek je enak za samico.



Slika 8

Končan postopek.



Postopek 2B: Japonska medaka (*Oryzias latipes*), predhodno tretiranje jeter za analizo vitelogenina

Iz kompleta za metodo ELISA se vzame steklenica pufra za homogenat in ohladi z zdrobljenim ledom (temperatura raztopine: ≤ 4 °C). Če se uporabi pufer za homogenat iz sistema EnBio ELISA, se raztopina odtaja pri sobni temperaturi, nato pa se steklenica ohladi z zdrobljenim ledom.

▼**M6**

Količina pufra za homogenat za jetra se izračuna na podlagi njihove teže (za homogenat se na miligram teže jeter doda 50 µl homogenata). Če jetra tehtajo na primer 4,5 mg, je količina pufra za homogenat za jetra 225 µl. Za vsa jetra se pripravi seznam količin pufra za homogenat.

Priprava jeter za predhodno tretiranje

(1) Neposredno pred predhodnim tretiranjem se iz zamrzovalnika vzame 1,5-mililitrska mikroepruveta z jetri.

(2) Jetra samcev je treba predhodno tretirati pred jetri samic, da se prepreči onesnaženje vitelogenina. Poleg tega je treba preskusne skupine predhodno tretirati po naslednjem vrstnem redu: kontrola, kontrola s topilom (če je primerno), najnižja koncentracija, srednja koncentracija, najvišja koncentracija in pozitivna kontrola.

(3) Število 1,5-mililitrskih mikroepruvet z vzorci jeter, vzetih iz zamrzovalnika ob danem času, ne sme presegati števila, ki se lahko hkrati centrifugira.

(4) Na rešetki za zamrzovanje se 1,5-mililitrske mikroepruvete z vzorci jeter razporedijo glede na številko vzorca (jeter ni treba odtajati).

Izvedba predhodnega tretiranja

1. Dodajanje homogenizacijskega pufra

(1) Na seznamu se preveri količina pufra za homogenat, ki ga je treba uporabiti za posamezen vzorec jeter, mikropipeta pa se nastavi (razpon količine: 100–1 000 µl) na ustrezno količino. Na mikropipeto se namesti čista konica.

(2) Pufer za homogenat se vzame iz steklenice za reagent in doda v 1,5-mililitrsko mikroepruveto z jetri.

(3) Pufer za homogenat se v skladu z zgoraj opisanim postopkom doda v vse 1,5-mililitrske mikroepruvete z jetri. Konice mikropipete ni treba zamenjati z novo. Če je konica onesnažena ali bi lahko bila onesnažena, jo je treba zamenjati.

2. Homogenizacija jeter

(1) Na homogenizator mikroepruvete se namesti novo pestilo.

(2) Pestilo se vstavi v 1,5-mililitrsko mikroepruveto. Homogenizator mikroepruvete se drži tako, da stisne jetra med površino pestila in notranjo steno 1,5-mililitrske mikroepruvete.

(3) Homogenizator mikroepruvete mora delovati od 10 do 20 sekund. Med delovanjem se 1,5-mililitrska mikroepruveta ohlaja z zdrobljenim ledom.

(4) Pestilo se dvigne iz 1,5-mililitrske mikroepruvete in približno 10 sekund pusti počivati. Nato se izvede vizualni pregled stanja suspenzije.

(5) Če se v suspenziji opazijo deli jeter, se ponovita koraka (3) in (4), da se pripravi zadovoljiv homogenat jeter.

▼**M6**

(6) Suspendirani homogenat jeter se do centrifugiranja hladi na rešetki za zamrzovanje.

(7) Za vsak homogenat se pestilo zamenja z novim.

(8) Vsa jetra se homogenizirajo s pufrom za homogenat v skladu z zgoraj opisanim postopkom.

3. Centrifugiranje suspendiranega homogenata jeter

(1) Temperatura ohlajene komore za centrifugiranje se potrdi pri ≤ 5 °C.

(2) V ohlajeno centrifugo se vstavijo 1,5-mililitrske mikroepruvete s suspendiranim homogenatom jeter (po potrebi se prilagodi ravnotežje).

(3) Suspendirani homogenat jeter se 10 minut centrifugira pri 13 000 g in ≤ 5 °C. Če pa so supernatanti ustrezno ločeni, se lahko sila in čas centrifugiranja po potrebi prilagodita.

(4) Po centrifugiranju se preveri, ali so supernatanti ustrezno ločeni (vrhnja plast: lipid, srednja plast: supernatant, spodnja plast: jetrno tkivo). Če ločitev ni ustrezna, se suspenzija ponovno centrifugira v enakih pogojih.

(5) Vsi vzorci se odstranijo iz ohlajene centrifuge in na rešetki za zamrzovanje razvrstijo po številki vzorca. Paziti je treba, da se ločene plasti po centrifugiranju ne suspendirajo ponovno.

4. Odvzemanje supernatanta

(1) Štiri 0,5-mililitrske mikroepruvete se za shranjevanje supernatanta položijo na rešetko za epruvete.

(2) Z mikropipeto se odvzame 30 µl vsakega supernatanta (ločenega kot srednja plast) in prenese v eno 0,5-mililitrsko mikroepruveto. Paziti je treba, da se ne odvzame lipid z vrhnje plasti ali jetrno tkivo s spodnje plasti.

(3) Supernatant se odvzame in prenese v dve drugi 0,5-mililitrski mikroepruveti na enak način, kot je opisano zgoraj.

(4) Z mikropipeto se odvzame preostali supernatant (če je mogoče: ≥ 100 µl). Nato se supernatant prenese v preostali 0,5-mililitrski mikroepruveti. Paziti je treba, da se ne odvzame lipid z vrhnje plasti ali jetrno tkivo s spodnje plasti.

(5) Pokrov 0,5-mililitrske mikroepruvete se zapre in na nalepko zapiše količina supernatanta. Takoj zatem se mikroepruvete ohladijo na rešetki za zamrzovanje.

(6) Za vsak supernatant se konica mikropipete zamenja z novo. Če se na konico prime veliko lipida, se takoj zamenja z novo, da se prepreči onesnaženje ekstrakta jeter z maščobo.

(7) Ves centrifugirani supernatant se prenese v štiri 0,5-mililitrske mikroepruvete v skladu z zgoraj opisanim postopkom.

▼M6

(8) Ko se supernatant prenese v 0,5-mililitrske mikroepruvete, se te postavijo na rešetko za epruvete z identifikacijskimi nalepkami in takoj nato zamrznejo v zamrzovalniku. Če se koncentracije VTG merijo takoj po predhodnem tretiranju, se ena 0,5-mililitrska mikroepruveta (ki vsebuje 30 µl supernatanta) ohrani hladna na rešetki za epruvete in prenese na delovno postajo, kjer se izvaja preskus ELISA. V takem primeru se preostale mikroepruvete postavijo na rešetke za epruvete in zamrznejo v zamrzovalniku.

(9) Po odvzemu supernatanta se ostanki primerno zavržejo.

Shranjevanje vzorca

Dokler se 0,5-mililitrske mikroperuvete s supernatantom homogenata jeter ne uporabijo za ELISA, se shranijo pri ≤ – 70 °C.

Postopek 3A: Cebrica, odvzem krvi iz repne vene/arterije

Takoj po anesteziji se repno steblo prečno prereže, pri čemer se kri iz repne arterije/vene odvzame s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko. Količine krvi so v razponu od 5 do 15 µl in so odvisne od velikosti ribe. V mikrokapilarno cevko se doda enaka količina pufra aprotinina (6 µgml v PBS), plazma pa se od krvi loči s centrifugiranjem (5 minut pri 600 g). Plazma se zbere v preskusnih epruvetah in shrani pri – 20 °C, dokler se ne analizira glede vitelogenina ali drugih zadevnih beljakovin.

Postopek 3B: Cebrica, odvzem krvi s srčno punkcijo

Da se prepreči koagulacija krvi in razgradnja beljakovin, se vzorci odvzamejo v fosfatnem pufru s soljo (PBS), ki vsebuje heparin (1 000 enot/ml) in aprotinin, ki zavira proteazo (2 TIU/ml). Za sestavine pufra se priporočajo heparin, amonijeva sol in liofilizirani aprotinin. Za vzorčenje krvi se priporoča brizga (1 ml) s pritrjeno tanko iglo (npr. Braun Omnikan-F). Brizga mora biti predhodno napolnjena s pufrom (približno 100 µl), da se iz vseh rib v celoti eluirajo majhne količine krvi. Vzorci krvi se odvzamejo s srčno punkcijo. Najprej je treba ribe anestezirati z MS-222 (100 mg/l). Ustrezna stopnja anestezije uporabniku omogoča, da loči srčni utrip cebric. Med punkcijo srca naj bo bat brizge pod rahlo napetostjo. Odvzeta količina krvi je v razponu med 20 in 40 mikrolitri. Po srčni punkciji je treba zmes krvi/pufra prenesti v preskusno epruveto. Plazma se od krvi loči s centrifugiranjem (20 minut, 5 000 g) in jo je treba shraniti pri – 80 °C, dokler se ne potrebuje za analizo.

Postopek 3C Standardni delovni postopek: cebrica, homogenizacija glave in repa

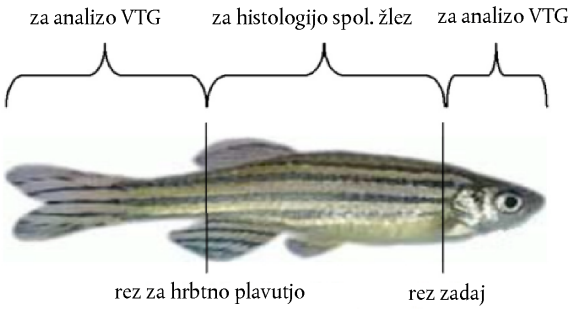
(1) Ribe se anesteziraj o in evtanazirajo v skladu z opisom preskusa.

(2) Glava in rep ribe se odrežeta v skladu s sliko 1.

Pomembno: med ravnanji s posameznimi ribami je treba vse instrumente za seciranje in rezalno desko sprati in ustrezno očistiti (npr. s 96-odstotnim etanolom), da se prepreči „vitelogeninsko onesnaženje“ neinduciranih samcev zaradi samic ali induciranih samcev.

▼**M6**

Slika 1



(3) Teža zbranih glav in repov posameznih rib se izmeri na najbližji miligram.

(4) Po tehtanju se deli vnesejo v ustrezne epruvete (npr. 1,5-mililitrske mikroepruvete) in zamrznejo pri – 80 °C do homogenizacije oz. dokler se neposredno ne homogenizirajo na ledu z dvema plastičnima pestiloma. (Druge metode se lahko uporabijo, če se izvajajo na ledu in zagotovijo homogeno maso.) Pomembno: epruvete je treba ustrezno oštevilčiti, da se lahko glava in rep ribe povežeta z ustreznim delom telesa, uporabljenim za histologijo spolnih žlez.

(5) Ko dobimo homogeno maso, se ji doda 4-kratna teža tkiva ledeno mrzlega homogenizacijskega pufra (*). Delo s pestiloma je treba nadaljevati, dokler zmes ni homogena. Pomembno opozorilo: za vsako ribo se uporabita dve novi pestili.

(6) Vzorci se postavijo na led do začetka centrifugiranja pri 4 °C in 50 000 × g za 30 minut.

(7) S pipeto se supernatant odmeri na dele po 20 µl v vsaj dve epruveti, tako da se konica pipete potopi pod plast maščobe na površini in supernatant previdno izsesa brez delcev maščobe ali peletov.

(8) Epruvete se do uporabe shranijo pri – 80 °C.

(*) **Homogenizacijski pufer:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-odstotna zmes inhibitorja protaze (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl zmesi inhibitorja protaze.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), npr. iz Bie & Berntsen, Danska.

— Zmes inhibitorja protaze: Sigma (za tkivo sesalcev), številka izdelka P 8340.

— *Opomba:* homogenizacijski pufer je treba uporabiti na dan priprave. Med uporabo ga je treba postaviti na led.

▼**M6**

Dodatek 7

Obogateni vzorci vitelogenina in medpreskusni referenčni standard

Vsak dan izvedbe preskusov vitelogenina se analizira obogateni vzorec, pripravljen z medpreskusnim referenčnim standardom. Vitelogenin, uporabljen za pripravo medpreskusnega referenčnega standarda, je iz serije, ki se razlikuje od serije, uporabljene za pripravo kalibracijskih standardov za preskus, ki se izvaja.

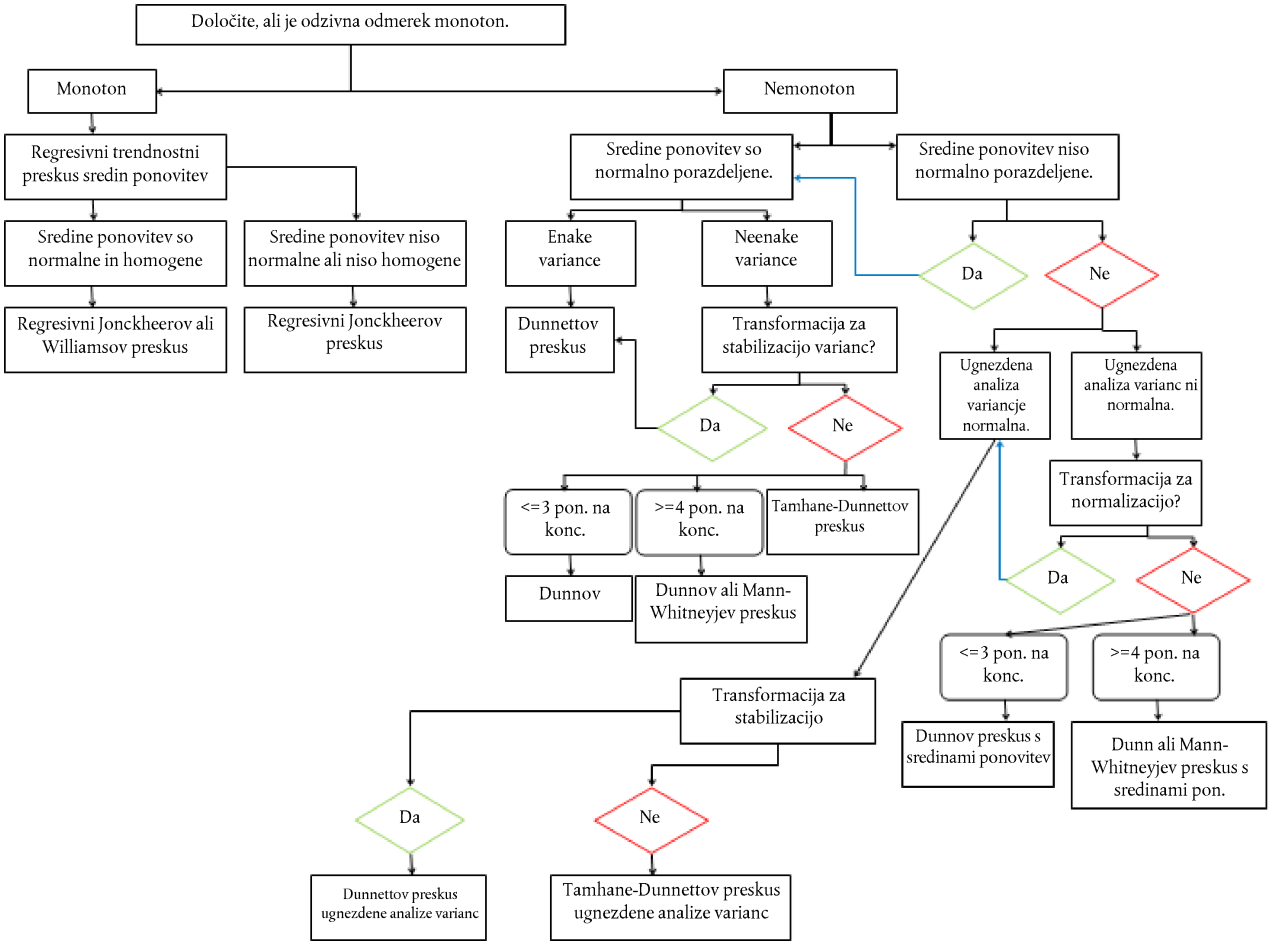
Obogateni vzorec se pripravi z dodajanjem znane količine medpreskusnega standarda vzorcu plazme kontrolnih samcev. Vzorec se obogati, da se doseže koncentracija vitelogenina, ki je med 10- in 100-krat večja od pričakovane koncentracije vitelogenina pri kontrolnih ribjih samcih. Vzorec plazme kontrolnih samcev, ki se obogati, lahko izvira iz ene ribe ali pa je sestavljen iz več rib.

Podvzorec neobogatene plazme kontrolnih samcev se analizira v vsaj dveh ponovitvenih vdolbinicah. Tudi obogateni vzorec se analizira v vsaj dveh ponovitvenih vdolbinicah. Srednja količina vitelogenina v dveh neobogatenih vzorcih plazme kontrolnih samcev se doda izračunani količini vitelogenina, dodanega obogatenim vzorcem, da se določi pričakovana koncentracija. Razmerje med pričakovano koncentracijo in izmerjeno koncentracijo se sporoči skupaj z rezultati posameznih nizov preskusov, izvedenih isti dan.

▼M6

Dodatek 8

Tabela poteka za statistično analizo



▼M6

C.38 PRESKUS PREOBRAZBE DVOŽIVK

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 231 (2009). Preskus, s katerim se lahko zaznajo kemikalije, ki so aktivne v ščitničnem sistemu vretenčarjev, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih povzročiteljev endokrinih motenj. Del naloge je bila priprava smernic za preskušanje za presejalno preskušanje kemikalij, ki so aktivne v ščitničnem sistemu vretenčarjev. Predlagana sta bila 28-dnevna študija oralne strupenosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih (poglavje B.7 te priloge) in preskus preobrazbe dvoživk (AMA). Izboljšana preskusna metoda B.7 je prestala validacijo, objavljena pa je bila revidirana preskusna metoda. Preskus preobrazbe dvoživk (AMA) je prestal validacijski program, ki je vključeval laboratorijske in medlaboratorijske študije, s katerimi sta bili dokazani ustreznost in zanesljivost preskusa (1) (2). Nato je validacijo preskusa strokovno pregledala skupina neodvisnih strokovnjakov (3). Ta preskusna metoda je rezultat izkušenj, pridobljenih med validacijskimi študijami za zaznavo kemikalij, ki vplivajo na ščitnico, in dela, opravljenega v državah članicah OECD.

NAČELO PRESKUSA

2. Preskus preobrazbe dvoživk (AMA) je presejalni preskus za empirično identifikacijo kemikalij, ki bi lahko vplivale na normalno funkcijo osi hipotalamus – hipofiza – ščitnica (HPT). AMA predstavlja posplošen model vretenčarja, saj temelji na ohranjenih strukturah in funkcijah osi HPT. Gre za pomemben preskus, ker je preobrazba dvoživk dobro proučen proces, odvisen od ščitnice, ki se odziva na kemikalije, aktivne v osi HPT, in je edini obstoječi preskus, s katerim se lahko zazna aktivnost ščitnice v živali, ki se morfološko razvija.

3. Splošni načrt poskusa zajema 21-dnevno izpostavljenost paglavcev *Xenopus laevis* v 51. fazi najmanj trem različnim koncentracijam preskusne kemikalije in kontroli z vodo za redčenje. Vsak preskusni tretirani vzorec ima štiri ponovitve. Gostota ličink na začetku preskusa je 20 paglavcev na preskusno posodo v vsaki tretirani skupini. Opazovane končne točke so dolžina zadnjega kraka, dolžina od ust do zadnjične odprtine (SVL), razvojna faza, mokra teža, histologija ščitnice in dnevna opazovanja smrtnosti.

OPIS METODE

Preskusna vrsta

4. *Xenopus laevis* se rutinsko goji v laboratorijih po vsem svetu in se lahko enostavno pridobi prek komercialnih dobaviteljev. Razmnoževanje se lahko pri tej vrsti skozi celo leto enostavno doseže z uporabo injekcij humanega horionskega gonadotropina (HCG), pri čemer se lahko nastale ličinke v velikem številu rutinsko gojijo do izbranih razvojnih faz, zaradi

▼M6

česar je mogoča uporaba protokolov preskusa, specifičnih za razvojno fazo. Za uporabo v preskusu so primernejše ličinke odraslih osebkov iz laboratorija. Čeprav to ni prednostni postopek, se lahko namesto tega jajčeca ali embrii pošljejo v laboratorij, ki izvaja preskus, in aklimatizirajo; pošiljanje v stadiju ličink za uporabo v preskusu ni sprejemljivo.

Oprema in potrebščine

5. Za izvedbo tega preskusa so potrebne naslednja oprema in potrebščine:

a) sistem za izpostavljanje (glej opis v nadaljevanju);

b) akvarij iz stekla ali nerjavnega jekla (glej opis v nadaljevanju);

c) posode za gojenje;

d) naprave za nadzor temperature (npr. grelniki ali hladilniki (prilagodljivi do 22 °C ± 1 °C));

e) termometer;

f) binokularni stereomikroskop;

g) digitalni fotoaparat z ločljivostjo vsaj 4 milijone slikovnih točk in funkcijo mikro;

h) programska oprema za digitalizacijo slik;

i) petrijevka (npr. 100 × 15 mm) ali prosojna plastična posodica primerljive velikosti;

j) analitska tehtnica, s katero je mogoče meriti na 3 decimalna mesta natančno (mg);

k) merilnik raztopljenega kisika;

l) merilnik vrednosti pH;

m) merilnik jakosti svetlobe, s katerim je mogoče meriti v luksih;

n) različna laboratorijska steklena posoda in pripomočki;

o) prilagodljive pipete (10 do 5 000 µl) ali različne pipete ustreznih velikosti;

p) preskusna kemikalija v zadostnih količinah za izvedbo študije, po možnosti iz ene serije;

q) analitski instrumenti, primerni za preskušano kemikalijo, ali pogodbene analitske storitve.

Kemijska preverljivost

6. AMA temelji na protokolu vodne izpostavljenosti, pri katerem se preskusna kemikalija uvaja v preskusne komore prek pretočnega sistema. Vendar pretočne metode omejujejo vrste kemikalij, ki se lahko preskusijo, kot določajo fizikalno-kemijske lastnosti kemikalije. Zato je treba pred uporabo tega protokola pridobiti osnovne informacije o kemikaliji, ki so pomembne za določitev preverljivosti, pri čemer je treba upoštevati Smernico OECD za preskušanje strupenosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem

▼M6

okolju (4). Značilnosti, ki kažejo, da bi lahko bilo kemikalijo težko preskusiti v vodnih sistemih, vključujejo: visok porazdelitveni koeficient oktanol/voda (log K_{ow}), visoko hlapnost, občutljivost za hidrolizo in občutljivost za fotolizo v laboratorijskih svetlobnih pogojih. Za določanje preverljivosti so lahko pomembni tudi drugi dejavniki, ki jih je treba določiti na podlagi posameznega primera. Če ni mogoč uspešen preskus kemikalije z uporabo pretočnega preskusnega sistema, se lahko uporabi sistem s statičnim obnavljanjem. Če noben sistem ne more sprejeti preskusne kemikalije, se ne preskuša z uporabo tega protokola.

Sistem izpostavljenosti

7. Kadar je mogoče, ima pretočni sistem za redčenje prednost pred sistemom s statičnim obnavljanjem. Če fizikalnih in/ali kemijskih lastnosti katere koli preskusne kemikalije ni mogoče podrediti pretočnemu sistemu za redčenje, se lahko uporabi nadomestni sistem izpostavljenosti (npr. s statičnim obnavljanjem). Sestavni deli sistema, ki pridejo v stik z vodo, morajo biti iz stekla, nerjavnega jekla in/ali politetrafluoroetilena. Vendar se lahko uporabi tudi ustrezna plastika, če ne vpliva na študijo. Posode za izpostavljanje morajo biti akvariji iz stekla ali nerjavnega jekla, opremljeni z dvižnimi cevmi, pri čemer mora biti približna prostornina posode med 4,0 in 10,0 l, najmanjša globina vode pa med 10 do 15 cm. Sistem mora podpirati vse koncentracije izpostavljenosti in kontrolo s štirimi ponovitvami na tretiranje. Pretok v posamezni posodi mora biti konstanten zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji (npr. 25 ml/min). Tretirane posode je treba naključno dodeliti na položaj v sistemu izpostavljenosti, da se zmanjšajo potencialni učinki zaradi položaja, vključno z majhnimi razlikami v temperaturi, jakosti svetlobe itd. Fluorescenčno osvetlitev je treba uporabiti za zagotovitev obdobja osvetljenosti 12 ur svetlobe: 12 ur teme pri jakosti od 600 do 2 000 luksov (lumnov/m^2) na vodni gladini. Temperaturo vode je treba vzdrževati pri 22 °C ± 1 °C, pH med 6,5 in 8,5, koncentracijo raztopljenega kisika (DO) pa > 3,5 mg/l (> 40 % nasičenosti z zrakom) v posamezni preskusni posodi. Najnižjo temperaturo vode, pH in koncentracijo raztopljenega kisika je treba meriti vsak teden; temperaturo je po možnosti treba stalno meriti v vsaj eni preskusni posodi. V Dodatku 1 so opisani poskusni pogoji, v katerih je treba izvesti protokol. Za več informacij o vzpostavitvi pretočnega sistema izpostavljenosti in/ali sistemov s statičnim obnavljanjem glej Standardne smernice ASTM za izvajanje preskusov akutne strupenosti na preskusnih materialih z ribami, velikimi vretenčarji in dvoživkami (5) ter splošne preskuse vodne toksikologije.

Kakovost vode

8. Uporabi se lahko vsaka lokalno razpoložljiva voda (npr. izvirska voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem), ki omogoča normalno rast in razvoj paglavcev *X. laevis*. Ker se lahko kakovost lokalne vode med posameznimi območji bistveno razlikuje, je treba izvesti analizo kakovosti vode, zlasti če niso na voljo historični podatki o uporabi vode za gojenje *Xenopus*. Posebno pozornost je treba nameniti zlasti zagotavljanju, da v vodi ni bakra, klora in kloraminov, ki so strupeni za žabe in paglavce. Priporoča se tudi analiza ravni naravnega ozadja fluorida, perklorata in

▼M6

klorata (stranski produkti dezinfekcije pitne vode) v vodi, ker so vsi ti anioni substrati prenašalca joda v ščitnični žlezi, pri čemer lahko višje ravni posameznega aniona kot moteči dejavniki vplivajo na rezultat študije. Analizo je treba izvesti pred začetkom preskušanja, v preskusni vodi pa običajno ne sme biti teh anionov.

Koncentracija jodida v preskusni vodi

9. Da lahko ščitnična žleza sintetizira ščitnični hormon, mora imeti ličinka na voljo dovolj jodida v vodi in hrani. Zdaj ni empiričnih smernic za najmanjše koncentracije jodida. Vendar lahko razpoložljivost jodida vpliva na odzivnost ščitničnega sistema na snovi, ki vplivajo na ščitnico, in spremeni bazalno aktivnost ščitnične žleze, tj. vidik, ki ga je treba upoštevati pri razlagi rezultatov histopatologije ščitnice. Zato je treba sporočiti izmerjene koncentracije jodida v preskusni vodi. Na podlagi razpoložljivih podatkov iz validacijskih študij je bilo dokazano, da je protokol uspešen, če so koncentracije jodida (I^-) v preskusni vodi med 0,5 in 10 μg/l. Najprimernejša najmanjša koncentracija jodida v preskusni vodi mora biti 0,5 μg/l. Če je preskusna voda modelna razredčevalna voda iz deionizirane vode, je treba dodati najmanjšo koncentracija joda, tj. 0,5 μg/l. Vsako dodajanje jodovih ali drugih soli v vodo je treba navesti v poročilu.

Vzdrževanje živali

Oskrba odraslih osebkov in razmnoževanje

10. Oskrba odraslih osebkov in razmnoževanje potekata v skladu s standardnimi smernicami, podrobnejše informacije pa so navedene v standardnih smernicah za izvajanje preskusa teratogeneze embriov žab (FETAX) (6). Take standardne smernice zagotavljajo primer ustreznih metod oskrbe in parjenja, vendar jih ni treba strogo upoštevati. Za začetek razmnoževanja se v pare (3–5) odraslih samic in samcev injicira humani horionski gonadotropin (HCG). V samice in samce se injicira približno 800 IU – 1 000 IU oz. 600 IU–800 IU HCG, raztopljenega v 0,6–0,9-odstotni solni raztopini. Pari, ki se razmnožujejo, so v velikih posodah, v okolju, ki jih ne ovira, in v statičnih pogojih, da se spodbuja ampleksus. Dno vsake posode za razmnoževanje mora imeti navidezno dno iz mreže iz nerjavnega jekla ali plastike, ki omogoča prehajanje jajčnih legel na dno posode. Žabe, ki so injicirane pozno popoldne, običajno odložijo večino jajčec do sredine naslednjega jutra. Ko je odloženih in oplojenih dovolj jajčec, je treba odrasle osebke odstraniti iz posod za razmnoževanje.

Oskrba in izbira ličink

11. Ko so odrasli osebki odstranjeni iz posod za razmnoževanje, se jajčeca zberejo, pri čemer se njihova sposobnost preživetja oceni z reprezentativno podskupino embriov iz vseh posod za razmnoževanje. Najboljše posamezne mreste (za oceno kakovosti mrestov se priporočajo 2–3) je treba ohraniti na podlagi sposobnosti preživetja embriov in prisotnosti ustreznega števila (najmanj 1 500) embriov. Vsi organizmi, ki se uporabijo v študiji, morajo izhajati iz enega mresta (tj. mresti se ne smejo mešati). Embrii se prenesejo v veliko ploščato skodelico ali posodo, vsa očitno mrtva ali nenormalna jajčeca (glej opredelitev iz točke (5)) pa se odstranijo

▼M6

s pipeto ali kapalko. Zdravi embrii iz vsakega od treh mrestov se prenesejo v tri ločene posode za izvalitev. Štiri dni po namestitvi v posode za izvalitev se na podlagi sposobnosti preživetja in uspešne izvalitve izbere najboljši mrest, ličinke pa se prenesejo v ustrezno število posod za gojenje pri temperaturi 22 °C ± 1 °C. Poleg tega se v dodatne posode prenese nekaj dodatnih ličink, ki se bodo uporabile kot zamenjava v primeru smrti v posodah za gojenje v prvem tednu. S tem postopkom se ohranja stalna gostota organizmov, s čimer se zmanjša razvojna divergenca v kohorti enega mresta. Vse posode za gojenje je treba vsak dan očistiti z izčrpanjem. Kot previdnostni ukrep se namesto rokavic iz lateksa priporoča uporaba rokavic iz vinila ali nitrila. Poginule ličinke je treba vsakodnevno odstranjevati in dodajati nadomestne, da se ohranja gostota organizmov v prvem tednu. Hranjenje mora potekati vsaj dvakrat na dan.

12. V fazi pred izpostavljenostjo se paglavci prilagodijo pogojem iz faze dejanske izpostavljenosti, vključno z vrsto hrane, temperaturo, ciklom svetlobe in teme ter gojiščem. Zato se priporoča, da se v fazi pred izpostavljenostjo in v fazi izpostavljenosti uporabi enaka voda za gojenje/redčenje. Če se za vzdrževanje paglavcev v fazi pred izpostavljenostjo uporablja statični gojitveni sistem, je treba gojišče zamenjati v celoti vsaj dvakrat na teden. Natrpanost, ki je posledica velike gostote ličink v obdobju pred izpostavljenostjo, je treba preprečiti, ker bi lahko pomembno vplivala na razvoj paglavcev v naslednji fazi preskušanja. Zato gostota gojenja ne sme presegati približno štirih paglavcev/l gojišča (statični sistem izpostavljenosti) oz. 10 paglavcev/l gojišča (npr. pri pretoku 50 ml/min v sistemu pred izpostavljenostjo ali gojitvenem sistemu). V teh pogojih se morajo paglavci v 12 dneh razviti od 45./46. faze do 51. faze. Pri reprezentativnih paglavcih iz populacije tega staleža je treba vsak dan pregledati razvojno fazo, da se oceni ustrezno časovno obdobje za začetek izpostavljenosti. Skrbno je treba čim bolj zmanjšati stres in travmo za paglavce, zlasti med seljenjem, čiščenjem akvarija in ravnanjem z ličinkami. Preprečiti je treba stresne razmere/dejavnosti, kot so glasen in nenehen hrup, trkanje po akvariju, tresljaji v akvariju, čezmerna dejavnost v laboratoriju in hitre spremembe v okolju (razpoložljivost svetlobe, temperatura, pH, raztopljeni kisik, pretok vode itd.). Če se paglavci v 17 dneh po oploditvi ne razvijejo do 51. faze, je treba kot potencialnega krivca obravnavati čezmeren stres.

Gojenje in hranjenje ličink

13. Paglavce se v celotnem obdobju pred izpostavljenostjo (po Nieuwkoopovi in Faberjevi (NF) 45./46. fazi (8)) in v celotnem 21-dnevnem preskusnem obdobju hrani s t. i. komercialno krmo za paglavce, uporabljeno v validacijskih študijah (glej tudi Dodatek 1), ali z drugo hrano, ki dokazano omogoča enako uspešnost preskusa preobrazbe dvoživk. Način hranjenja v obdobju pred izpostavljenostjo je treba skrbno prilagoditi, da se izpolnijo potrebe razvijajočih se paglavcev. To pomeni, da je treba novo izvaljenim paglavcem večkrat na dan (vsaj dvakrat) dati manjši obrok hrane. Dovajanje čezmernih količin hrane je treba preprečiti, da *i)* se ohrani kakovost vode in *ii)* prepreči zamašitev filtrirnega aparata z delci in ostanki hrane. Pri krmi za paglavce, uporabljeni v validacijskih študijah, je treba dnevne

▼M6

obroke hrane malo pred začetkom preskusa povečati glede na rast paglavcev na približno 30 mg/žival/dan. V validacijskih študijah je bilo dokazano, da ta komercialno dostopna krma podpira ustrezno rast in razvoj paglavcev *X. laevis* in je v drobnih delcih, ki se v vodnem stolpcu dlje časa ne raztopijo in jih odplakne tok. Zato je treba skupno dnevno količino hrane razdeliti na manjše obroke in jo dovajati vsaj dvakrat na dan. Način hranjenja s to krmo je naveden v tabeli 1. Stopnje hranjenja je treba zabeležiti. Dovaja se lahko suha ali kot založna raztopina, pripravljena v vodi za redčenje. Tako založno raztopino je treba sveže pripraviti vsak drugi dan in jo hraniti pri 4 °C, kadar se ne uporablja.

Tabela 1

Način hranjenja s komercialno krmo za paglavce, uporabljeno v validacijskih študijah za paglavce *X. laevis*, v delu preskusa preobrazbe dvoživk z živimi živalmi v pretočnih pogojih

Dan študije	Obrok hrane (mg krme/žival/dan)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analitična kemija

14. Pred izvedbo študije je treba oceniti stabilnost preskusne kemikalije na podlagi informacij o njeni topnosti, razgradljivosti in hlapnosti. Preskusne raztopine iz vsake ponovitvene posode pri posamezni koncentraciji je treba vzorčiti za analize analitične kemije na začetku preskusa (dan 0) in vsak teden med preskusom za najmanj štiri vzorce. Priporočeno je tudi, da se vsaka preskusna koncentracija analizira med pripravo sistema, pred začetkom preskusa, da se preveri učinkovitost sistema. Poleg tega se priporoča, da se založne raztopine analizirajo, ko se zamenjajo, zlasti če prostornina založne raztopine ne zagotavlja zadostnih količin kemikalije, ki bi pokrivale trajanje rutinskih obdobij vzorčenja. V primeru kemikalij, ki jih pri nekaterih ali vseh koncentracijah, uporabljenih v preskusu, ni mogoče zaznati, je treba izmeriti založno raztopino in zabeležiti pretok sistema, da se izračunajo nominalne koncentracije.

Dodajanje kemikalije

15. Metoda, ki se uporablja za uvajanje preskusne kemikalije v sistem, se lahko razlikuje glede na njene fizikalno-kemijske lastnosti. Vodotopne kemikalije se lahko raztopijo v alikvotih preskusne vode pri koncentraciji, ki omogoča dodajanje pri ciljni preskusni koncentraciji v pretočnem sistemu. Kemikalije, ki so pri sobni temperaturi tekoče in težko topne v vodi, se lahko uvajajo z metodami saturacijske kolone za izmenjavo med tekočinama. Kemikalije, ki so pri sobni temperaturi trdne in težko topne v vodi, se lahko uvajajo s saturacijskimi kolonami iz steklene volne (7). Priporoča se uporaba preskusnega sistema brez nosilca, vendar imajo različne preskusne kemikalije različne fizikalno-kemijske lastnosti, zaradi katerih bodo verjetno potrebni različni pristopi za pripravo vode za izpostavljenost kemikalijam. Če je mogoče, se ne uporabijo topila ali nosilci, ker: *i)* lahko nekatera topila povzročijo strupenost in/ali neželene ali nepričakovane endokrinološke odzive, *ii)* lahko preskušanje kemikalij nad

▼M6

njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev učinkovitih koncentracij in *iii)* lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobno dejavnostjo. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD za preskušanje strupenosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (4). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti kemikalije. Topila, za katera je bilo ugotovljeno, da so učinkovita za preskušanje strupenosti v vodnem okolju, vključujejo aceton, etanol, metanol, dimetil formamid in trietilen glikol. Če se uporabi topilo kot nosilec, morajo biti koncentracije topila nižje od kronične koncentracije brez opaznega učinka (NOEC); v skladu s Smernico OECD se priporoča največ 100 µl/l; v skladu z nedavnim pregledom se priporoča uporaba tako nizkih koncentracij topil, kot je 20 µl/l vode za redčenje (12). Če se uporabijo topila kot nosilci, je treba poleg kontrol brez topila (čista voda) oceniti ustrezne kontrole s topilom. Če kemikalije ni mogoče dodati prek vode zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti (slaba topnost) ali omejene razpoložljivosti kemikalije, se lahko prouči uvajanje s prehrano. V zvezi s prehransko izpostavljenostjo je bilo opravljeno predhodno delo, vendar se ta način izpostavljenosti ne uporablja pogosto. Izbiro metode je treba dokumentirati in analitsko preveriti.

Izbira preskusnih koncentracij

Vzpostavitev visoke preskusne koncentracije

16. Za namen tega preskusa je treba visoko preskusno koncentracijo določiti z mejo topnosti preskusne kemikalije, najvišjo tolerančno koncentracijo (MTC) za akutno strupene kemikalije ali 100 mg/l (kar koli je najnižje).

17. MTC je opredeljena kot najvišja preskusna koncentracija kemikalije, ki povzroči manj kot 10-odstotno akutno smrtnost. Pri uporabi tega pristopa se domneva, da obstajajo empirični podatki o akutni smrtnosti, na podlagi katerih je mogoče oceniti MTC. Ocena MTC je lahko netočna, pri čemer je običajno potrebna strokovna presoja. Čeprav je lahko uporaba regresijskih modelov tehnično najzanesljivejši pristop za oceno MTC, se lahko uporaben približek MTC izpelje iz obstoječih akutnih podatkov z uporabo 1/3 vrednosti akutne LC_{50}. Vendar podatki o akutni strupenosti za vrste, ki se preskušajo, niso nujno na voljo. Če podatki o akutni strupenosti, specifični za vrsto, niso na voljo, se lahko pri paglavcih, ki so reprezentativni (tj. so enake faze) za paglavce v preskusu AMA, opravi 96-urni preskus LC_{50}. Če so na voljo podatki za druge vodne vrste (npr. študije LC_{50} pri ribah ali drugih dvoživkah), se lahko verjetna MTC oceni s strokovno presojo na podlagi ekstrapolacije med vrstami.

18. Če kemikalija ni akutno strupena in je topna pri koncentraciji, višji od 100 mg/l, pa je treba šteti za najvišjo preskusno koncentracijo (HTC) 100 mg/l, ker se ta koncentracija običajno šteje za „praktično nestrupeno“.

▼M6

19. Čeprav metode statičnega obnavljanja niso priporočeni postopek, se lahko uporabljajo, kadar pretočne metode niso ustrezne za doseganje MTC. Če se uporabijo metode statičnega obnavljanja, je treba dokumentirati stabilnost koncentracije preskusne kemikalije, pri čemer mora stabilnost ostati v mejah izvedbenih meril. Priporočajo se 24-urna obdobja obnavljanja. Obdobja obnavljanja, ki presegajo 72 ur, niso sprejemljiva. Ob koncu vsakega obdobja obnavljanja, neposredno pred obnavljanjem, je treba izmeriti parametre kakovosti vode (npr. raztopljeni kisik, temperaturo, pH itd.).

Razpon preskusnih koncentracij

20. Uporabiti je treba *vsaj* tri preskusne koncentracije in kontrole s čisto vodo (ter po potrebi kontrole z vehiklom). Najmanjša razlika med najnižjo in najvišjo preskusno koncentracijo mora biti približno en red velikosti. Največja ločitev odmerka je 0,1 in najmanjša 0,33.

POSTOPEK

Začetek in izvedba preskusa

Dan 0

21. Izpostavljanje je treba začeti, ko zadostno število paglavcev iz založne populacije pred izpostavljenostjo doseže 51. razvojno fazo po Nieuwkoopu in Faberju (8), pri čemer so glede na oploditev stari manj ali točno 17 dni. Za izbiro preskusnih živali je treba zdrave paglavce iz založne populacije, ki so videti normalni, združiti v eni posodi, ki vsebuje primerno prostornino vode za redčenje. Za določanje razvojne faze je treba posamezne paglavce odstraniti iz skupne posode z majhno mrežo ali cedilom in jih prenesti v prozorno merilno komoro (npr. 100-milimetrsko petrijevko) z vodo za redčenje. Priporočljivo je, da se za določanje faze ne uporablja anestezija, vendar se lahko za anestezijo paglavcev uporabi 100 mg/l trikain metan sulfonata (npr. MS-222), ki je pred uporabo ustrezno pufran z natrijevim karbonatom (pH 7.0). Če se za anestezijo uporabi npr. MS-222, je treba metodologijo za njegovo ustrezno uporabo pridobiti v izkušenih laboratorijih in jo sporočiti skupaj z rezultati preskusa. Med prenosom je treba z živalmi ravnati zelo previdno, da se čim bolj zmanjša stres zaradi prenosa in se preprečijo poškodbe.

22. Razvojna faza živali se določi z binokularnim stereomikroskopom. Da se zmanjša končna variabilnost v razvojni fazi, je pomembno, da se faza določi čim bolj natančno. Po Nieuwkoopu in Faberju (8) je glavni razvojni znak za določitev 51. faze pri organizmih morfologija zadnjega kraka. Morfološke značilnosti zadnjega kraka je treba pregledati pod mikroskopom. Čeprav se je treba za določanje razvojne faze paglavcev seznaniti z Nieuwkoopovimi in Faberjevimi (8) smernicami v celoti, se lahko faza zanesljivo določi na podlagi izrazitih morfoloških znakov. Naslednja tabela se lahko uporabi za poenostavitev in standardizacijo postopka določanja faze skozi celotno študijo, tako da se določijo izraziti morfološki znaki, ki so povezani z različnimi fazami, pri čemer se predvideva, da je razvoj normalen.

▼M6

Tabela 2

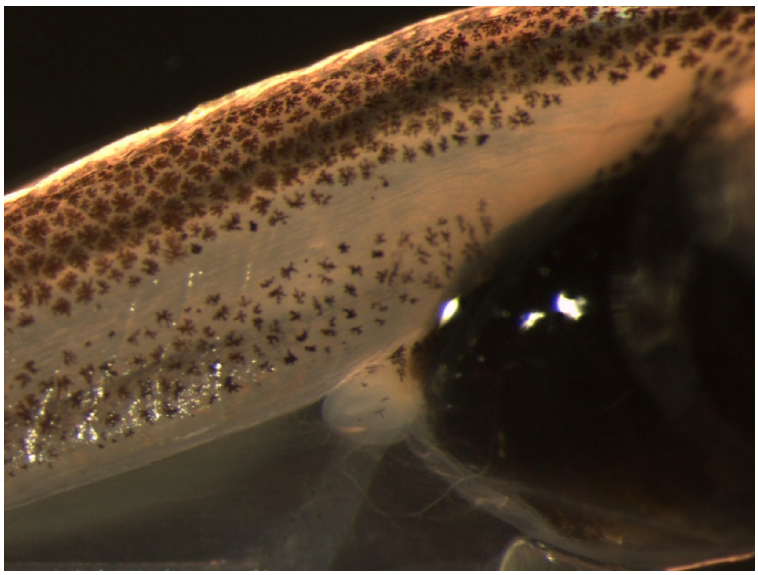
Izraziti morfološki znaki za določanje faze na podlagi smernic Nieuwkoopa in Faberja

Izraziti morfološki znaki	Razvojna faza															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
zadnji krak	X	X	X	X	X	X	X									
sprednji krak						X	X	X	X	X						
kraniofacialna struktura										X	X	X	X			
morfologija vohalnega živca											X	X	X			
dolžina repa													X	X	X	X

23. Za začetek preskusa morajo biti vsi paglavci v 51. fazi. Najizrazitejši morfološki znak za določanje navedene faze je morfologija zadnjega kraka, ki je prikazana na sliki 1.

Slika 1

Morfologija zadnjega kraka pri paglavcu *X. laevis* v 51. fazi.



24. Poleg izbire razvojne faze se lahko uporabi neobvezna izbira velikosti poskusnih živali. Za ta namen je treba na dan 0 izmeriti dolžino celega telesa (ne SVL) na podvzorcu približno 20 paglavcev v 51. fazi po Nieuwkoopu in Faberju. Po izračunu srednje dolžine celega telesa te skupine živali se lahko določijo največje in najmanjše mejne dolžine celotnega telesa poskusnih živali, pri čemer je dovoljeni razpon srednje vrednosti ± 3 mm (srednje vrednosti razpona dolžin celotnega telesa med 24,0 in 28,1 mm za paglavce v 51. fazi). Vendar je določanje razvojne faze glavni parameter za ugotavljanje pripravljenosti posamezne preskusne živali. Paglavci, ki kažejo zelo vidne deformnosti ali poškodbe, je treba izključiti iz preskusa.

▼**M6**

25. Paglavci, ki izpolnjujejo merila za fazo, opisana zgoraj, se zadržijo v posodi s čisto vodo za gojenje, dokler ni postopek določanja faze končan. Ko je določanje faze končano, se ličinke naključno razporedijo v tretirane posode za izpostavljenost, dokler ni v vsaki posodi po 20 ličink. V vsaki tretirani posodi se nato pregleda, ali so v njej živali, ki so videti nenormalno (npr. poškodbe, nenormalen način plavanja itd.). Očitno nezdrave paglavce je treba odstraniti iz tretiranih posod in jih nadomestiti z ličinkami, ki se na novo izberejo iz skupne posode.

Opažanja

26. Za bolj poglobljene informacije o postopkih prekinitve preskusa in obdelavi paglavcev glej Smernico OECD za histologijo ščitnice pri dvoživkah (9).

Meritve na 7. dan

27. Na 7. dan se iz vsake preskusne posode odstrani pet naključno izbranih paglavcev na ponovitev. Z uporabljenim naključnim postopkom je treba vsakemu organizmu, ki se preskuša, zagotoviti enako verjetnost izbire. To je mogoče doseči z uporabo katere koli metode naključnega vzorca, vendar je pri tem treba ujeti vsakega paglavca. Neizbrani paglavci se vrnejo v posodo, iz katere so bili zajeti, izbrani paglavci pa se humano evtanazirajo v npr. 150 do 200 mg/l MS-222 in ustrezno pufrajo z natrijevim karbonatom, da se doseže pH 7,0. Evtanazirani paglavci se sperejo v vodi in posušijo, nato pa se njihova telesna teža določi na najbližji miligram. Določijo se dolžina zadnjega kraka, dolžina od ust do zadnjične odprtine in razvojna faza (z binokularnim stereomikroskopom) vsakega paglavca.

Meritve na 21. dan (prekinitev preskusa)

28. Ob prekinitvi preskusa (21. dan) se preostali paglavci odstranijo iz preskusnih posod in humano evtanazirajo v npr. 150 do 200 mg/l MS-222 ter ustrezno pufrajo z natrijevim bikarbonatom, kot je navedeno zgoraj. Paglavci se sperejo v vodi in posušijo, nato pa se njihova telesna teža določi na najbližji miligram. Izmerijo se razvojna faza, SVL in dolžina zadnjega kraka vsakega paglavca.

29. Vse ličinke se za 48 do 72 ur prestavijo v Davidsonovo fiksirno raztopino kot vzorci celotnega telesa ali kot vzorci obrezanega tkiva glave, ki vključujejo spodnjo čeljust za histološko oceno. Za histopatologijo je treba vzorčiti skupaj pet paglavcev iz vsake ponovitvene posode. Ker je višina folikularnih celic odvisna od faze (10), je najustreznejši pristop vzorčenja za histološke analize uporaba osebkov iste faze, kadar koli je mogoče. Za izbiro osebkov iste faze je treba fazo vseh ličink prvič določiti pred izbiro ter nadaljnjo obdelavo za zbiranje podatkov in shranjevanje. To je potrebno, ker bo zaradi divergence pri razvoju prišlo do različnih porazdelitev faz v posameznih ponovitvenih posodah.

30. Živali, izbrane za histopatologijo (n = 5 iz vsake ponovitve), je treba uskladiti s srednjo fazo kontrol (združene ponovitve), kadar koli je mogoče. Če je v ponovitvenih posodah več kot pet ličink ustrezne faze, se pet ličink naključno izbere.

▼M6

31. Če je v ponovitvenih posodah manj kot pet ličink ustrezne faze, je treba vzorčiti naključno izbrane osebke naslednje nižje ali višje razvojne faze, da se doseže skupna velikost vzorca petih ličink na ponovitev. Priporoča se, da se odločitev o vzorčenju dodatnih ličink iz naslednje nižje ali višje razvojne stopnje sprejme na podlagi splošne ocene porazdelitve faz v kontrolah in skupinah za kemične obdelave. To pomeni, da je treba vzorčiti dodatne ličinke iz naslednje nižje faze, če je kemična obdelava povezana z razvojno zaostalostjo. Če je kemična obdelava povezana s pospešitvijo razvoja, pa je treba vzorčiti dodatne ličinke iz naslednje višje faze.

32. V primerih resnih sprememb razvoja paglavcev zaradi tretiranja s preskusno kemikalijo se porazdelitev faz v skupinah za kemično obdelavo morda ne bo prekrivala z izračunano srednjo razvojno fazo kontrole. Samo v teh primerih je treba postopek izbire spremeniti z uporabo faze, ki se razlikuje od srednje faze kontrole, da se doseže vzorčenje ličink enake faze za histopatologijo ščitnice. Če so faze nedoločljive (tj. asinhronost), je treba za histološko analizo naključno izbrati 5 paglavcev iz vsake ponovitve. Vzorčenje katere koli ličinke, ki ni v fazi, enakovredni srednji razvojni fazi kontrole, je treba utemeljiti.

Določanje bioloških končnih točk

33. V 21-dnevni fazi izpostavljenosti se 7. in 21. dan izvede meritev primarnih končnih točk, vendar je treba preskusne živali opazovati vsak dan. V tabeli 3 je naveden pregled končnih točk meritev in ustreznih časovnih točk opazovanja. Podrobnejše informacije za tehnične postopke meritve zgornjih končnih točk in histološke ocene so navedene v smernicah OECD (9).

Tabela 3

Časovne točke opazovanja za primarne končne točke pri AMA

Zgornje končne točke	Vsak dan	7. dan	21. dan
— smrtnost	•		
— razvojna faza		•	•
— dolžina zadnjega kraka		•	•
— dolžina od ust do zadnjične odprtine		•	•
— teža mokrega telesa		•	•
— histologija ščitnične žleze			•

▼M6

Zgornje končne točke

34. Razvojna faza, dolžina zadnjega kraka, SVL in mokra teža so zgornje končne točke AMA, pri čemer je vsaka na kratko obravnavana v nadaljevanju. Dodatne tehnične informacije za zbiranje teh podatkov, vključno s postopki za računalniško podprte analize, katerih uporaba se priporoča, so navedene v smernicah, na katere so navedeni sklici.

Razvojna faza

35. Razvojna faza paglavcev *X. laevis* se določi z merili za določanje faze po Nieuwkoopu in Faberju (8). Podatki o razvojni fazi se uporabijo pri ugotavljanju, ali je razvoj pospešen, asinhron, zakasnjen ali nespremenjen. Pospešen ali zakasnjen razvoj se določi s primerjavo med srednjo fazo, ki jo dosežejo kontrolne in tretirane skupine. Asinhroni razvoj je ugotovljen, če pregledana tkiva niso deformirana ali nenormalna, vendar je relativen čas morfogeneze ali razvoja različnih tkiv moten pri enem paglavcu.

Dolžina zadnjega kraka

36. Diferenciacijo in rast zadnjih krakov nadzorujejo hormoni ščitnice in so pomemben razvojni znak, ki se že uporablja za določanje razvojne faze. Razvoj zadnjega kraka se pri določanju razvojne stopnje uporablja kvalitativno, vendar se tukaj obravnava kot kvantitativna končna točka. Zato se dolžina zadnjega kraka meri kot končna točka za ugotavljanje učinkov na ščitnično os (slika 2). Zaradi doslednosti se dolžina zadnjega kraka meri na zadnjem levem kraku. Dolžina zadnjega kraka se oceni 7. dan in 21. dan preskusa. Na 7. dan je merjenje dolžine zadnjega kraka enostavno, kot je prikazano na sliki 2. Merjenje dolžine zadnjega kraka na 21. dan pa je bolj zapleteno zaradi ukrivljenosti kraka. Zato se mora meritev dolžine zadnjega kraka na 21. dan začeti pri telesni steni in nadaljevati po sredinski črti kraka prek vseh kotov odstopanja. Spremembe dolžine zadnjega kraka na 7. dan se štejejo za pomembne za potencialno aktivnost ščitnice, čeprav na 21. dan niso očitne. Meritve dolžin se pridobijo na podlagi digitalnih fotografij z uporabo programske opreme za analizo slik, kot je opisano v Smernici OECD za histologijo ščitnice pri dvoživkah (9).

Dolžina telesa in teža mokrega telesa

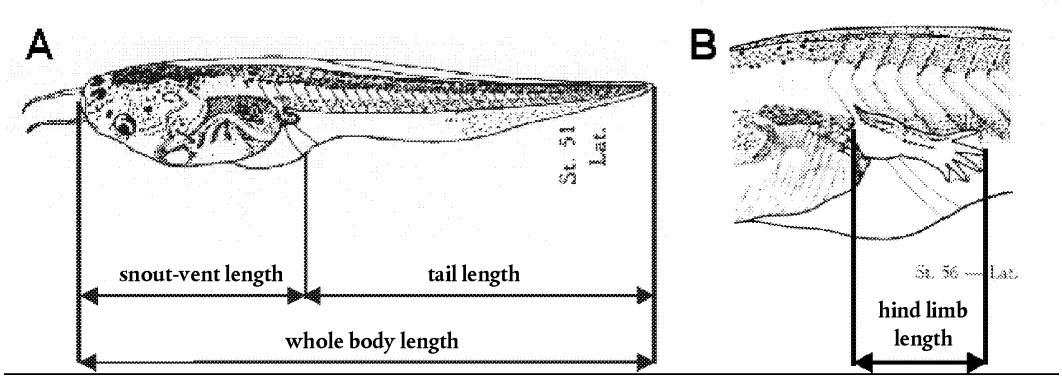
37. Določanje dolžine od ust do zadnjične odprtine (SVL) (slika 2) in mokre teže je v protokol preskusa vključeno, da se ocenijo možni učinki preskusne kemikalije na hitrost rasti paglavcev v primerjavi s kontrolno skupino, in je koristno pri ugotavljanju posplošene strupenosti za preskusno kemikalijo. Ker se lahko zaradi odstranitve adherentne vode za določanje teže ustvarijo stresni pogoji za paglavce in se lahko poškoduje njihova koža, se te meritve izvajajo na 7. dan pri paglavcih iz podvzorca, pri vseh ostalih paglavcih pa ob prekinitvi preskusa (21. dan). Zaradi doslednosti je treba kot repno mejo za meritev upoštevati kranialno stran zadnjične odprtine.

38. Dolžina od ust do zadnjične odprtine (SVL) se uporabi za oceno rasti paglavca, kot je prikazano na sliki 2.

▼M6

Slika 2

(A) Vrste meritev dolžine telesa in (B) meritve zadnjega kraka pri paglavcih *X. laevis* (1)



Histologija ščitnične žleze

39. Čeprav sta razvojna faza in dolžina zadnjega kraka pomembni končni točki za oceno sprememb pri metamorfnem razvoju, povezanih z izpostavljenostjo, se zakasnjeni razvoj sam po sebi ne more šteti za diagnostični kazalnik protiščitničnega delovanja. Nekatere spremembe so lahko opazne le z rutinsko histopatološko analizo. Diagnostična merila vključujejo hipertrofijo/atrofijo ščitnične žleze, hipertrofijo folikularnih celic, hiperplazijo folikularnih celic, dodatna kvalitativna merila pa območje svetline folikla, kakovost koloida in velikost/obliko folikularne celice. Poročati je treba o razvrstitvi resnosti (4 stopnje). Informacije o odvzemu in obdelavi vzorcev za histopatološko analizo in izvedbo histopatoloških analiz na vzorcih tkiva so na voljo v dokumentih „Preskus metamorfoze dvoživk: Del 1 – Tehnične smernice za morfološko vzorčenje in histološko pripravo“ in „Preskus metamorfoze dvoživk: Del 2 – Pristop k branju študij, diagnostičnim merilom, razvrstitvi resnosti in atlasu“ (9). Laboratoriji, ki preskus izvajajo prvič, se morajo pred izvedbo histološke analize in oceno ščitnične žleze zaradi usposabljanja posvetovati z izkušenimi patologi. Zaradi očitnih in znatnih sprememb zgornjih končnih točk, ki kažejo pospešen razvoj ali asinhronost, morda ne bo potrebna histopatološka analiza ščitnične žleze. Zaradi odsotnosti očitnih morfoloških sprememb ali dokazov o zakasnjenem razvoju pa so histološke analize upravičene.

Smrtnost

40. Vsak dan je treba pregledati, ali so v preskusnih posodah mrtvi paglavci, in zabeležiti številke za posamezne posode. Za vsak primer smrtnosti je treba zabeležiti datum, koncentracijo in številko posode. Mrtve živali je treba takoj po ugotovitvi smrtnosti odstraniti iz preskusnih posod. Stopnje smrtnosti, ki presegajo 10 %, lahko kažejo neustrezne preskusne pogoje ali strupene učinke preskusne kemikalije.

Dodatna opažanja

41. Primere nenormalnega obnašanja ter zelo vidne deformnosti in lezije je treba zabeležiti. Za vsako opaženo nenormalno obnašanje, velike deformnosti ali lezije je treba zabeležiti datum, koncentracijo in številko posode. Za normalno obnašanje je značilno, da paglavci v vodnem stolpcu z repom nad glavo redno ritmično udarjajo z repno plavutjo, redno prihajajo na

▼M6

površino, premikajo škržni poklopec in se odzivajo na dražljaje. Nenormalno obnašanje bi na primer vključevalo lebdenje na gladini, ležanje na dnu posode, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje. Zabeležiti je treba tudi velike razlike pri porabi hrane med tretiranji. Velike deformnosti in lezije lahko med drugim vključujejo morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije, bakterijske ali glivične okužbe. Te ugotovitve so kvalitativne, pri čemer jih je treba obravnavati podobno kot klinične znake bolezni/stresa in jih primerjati s kontrolnimi živalmi. Če je pojavnost ali stopnja pojavnosti v izpostavljenih posodah večja kot v kontrolnih posodah, jo je treba obravnavati kot dokaz očitne strupenosti.

PODATKI IN POROČANJE

Zbiranje podatkov

42. Vse podatke je treba zbrati z elektronskimi ali ročnimi sistemi, ki upoštevajo dobro laboratorijsko prakso (GLP). Podatki študije morajo obsegati:

Preskusna kemikalija:

— opis preskusne kemikalije: fizikalno-kemijske lastnosti, informacije o stabilnosti in biološki razgradljivosti,

— informacije in podatke o kemikaliji: metodo in pogostost priprave razredčin. Informacije o preskusni kemikaliji vključujejo aktualne in nominalne koncentracije preskusne kemikalije ter v nekaterih primerih nematične kemikalije, kot je ustrezno. Za založne raztopine in preskusne raztopine bodo morda potrebne meritve preskusne kemikalije,

— topilo (če ni voda): utemeljitev izbire topila in opis topila (vrsta, uporabljena koncentracija).

Preskusni pogoji:

— operativne evidence: zajemajo opažanja v zvezi z delovanjem preskusnega sistema ter podpornega okolja in infrastrukture. Običajne evidence vključujejo: sobno temperaturo, preskusno temperaturo, obdobje osvetljenosti, stanje kritičnih delov sistema izpostavljenosti (npr. črpalke, števci ciklov, tlaki), pretoke, vodostaj, spremembe standardne steklenice in evidence prehranjevanja. Parametri splošne kakovosti vode vključujejo: pH, raztopljeni kisik, prevodnost, skupni jod, alkalnost in trdoto,

— odstopanja od preskusne metode: te informacije morajo vključevati vse informacije ali pripovedne opise odstopanj od preskusne metode.

Rezultati:

— biološka opažanja in podatki: ti vključujejo dnevna opažanja smrtnosti, porabe hrane, nenormalnega načina plavanja, letargije, izgube ravnotežja, deformnosti, lezij itd. Opažanja in podatki, zbrani v vnaprej določenih časovnih razmikih, vključujejo: razvojno fazo, dolžino zadnjega kraka, dolžino od ust do zadnjične odprtine in mokro težo,

▼M6

— tehnike statistične analize in utemeljitev uporabljenih tehnik, rezultati statistične analize, po možnosti v tabeli,

— histološki podatki: ti vključujejo pripovedne opise ter razvrščeno resnost in pogostnost specifičnih opažanj, kot je navedeno v smernici za histopatologijo,

— *ad-hoc* opažanja: ta opažanja morajo vključevati pripovedne opise študije, ki jih ni mogoče razvrstiti v zgoraj opisane kategorije.

Poročanje podatkov

43. Dodatek 2 vsebuje razpredelnice za dnevno zbiranje podatkov, ki se lahko uporabijo kot smernica za vnos neobdelanih podatkov in izračune statističnega povzetka. Navedene so tudi tabele za poročanje, ki so uporabne za sporočanje povzetkov podatkov o končnih točkah. Tabele za poročanje za histološke ocene so navedene v Dodatku 2.

Izvedbena merila in sprejemljivost/veljavnost preskusa

44. Na splošno bodo posledica velikih odstopanj od preskusne metode podatki, nesprejemljivi za razlago ali poročanje. Zato so bila naslednja merila iz tabele 4 pripravljena kot smernica za določanje kakovosti izvedenega preskusa, splošne uspešnosti kontrolnih organizmov.

Tabela 4

Izvedbena merila za AMA

Merilo	Sprejemljive meje
Preskusne koncentracije	V 21-dnevnem preskusu se ohranjajo pri ≤ 20 % KV (variabilnost izmerjenih preskusnih koncentracij).
Smrtnost v kontrolah	≤ 10 % – smrtnost v nobeni ponovitvi v kontrolah ne sme preseči 2 paglavcev.
Najnižja srednja razvojna faza kontrol na koncu preskusa	57
Razpon razvojnih stopenj v kontrolni skupini	Deseti in 90. centil porazdelitve razvojnih faz se ne smeta razlikovati za več kot 4 faze.
Raztopljeni kisik	≥ 40 % nasičenosti z zrakom (*)
pH	pH je treba vzdrževati med 6,5 in 8,5. Razlike med ponovitvami/tretiranji ne smejo presegati 0,5.
Temperatura vode	22 °C ± 1 °C – razlike med ponovitvami/tretiranji ne smejo presegati 0,5 °C.
Preskusne koncentracije brez očitne strupenosti	≥ 2
Uspešnost ponovitev	Ogrozita se lahko ≤ 2 ponovitvi v celotnem preskusu.

▼M6

Merilo	Sprejemljive meje
Posebni pogoji za uporabo topila	Če se uporabi topilo kot nosilec, je treba uporabiti kontrolo s topilom in kontrolo s čisto vodo ter poročati o rezultatih.
	Statistično značilne razlike med kontrolno skupino s topilom in kontrolno skupino z vodo se obravnavajo posebej. Več informacij je navedenih v nadaljevanju.
Posebni pogoji za sistem s statičnim obnavljanjem	Poročati je treba o reprezentativnih kemijskih analizah pred obnavljanjem in po njem.
	Ravni amoniaka je treba izmeriti neposredno pred obnavljanjem.
	Vse parametre kakovosti vode iz tabele 1 iz Dodatka 1 je treba izmeriti neposredno pred obnavljanjem.
	Obdobje obnavljanja ne sme biti daljše od 72 ur.
	Ustrezen časovni razpored hranjenja (50 % dnevnega obroka komercialne krme za paglavce)

(*) Prezračevanje vode se lahko izvaja s cevko za ustvarjanje mehurčkov. Cevke za ustvarjanje mehurčkov je priporočljivo nastaviti na ravni, ki ne povzročajo nepotrebnega stresa pri paglavcih.

Veljavnost preskusa

45. Da se preskus šteje za sprejemljiv/veljaven, morajo biti izpolnjene naslednje zahteve:

veljaven poskus v zvezi z negativnim preskusom za aktivnost ščitnice:

(1) smrtnost v nobenem tretiranem vzorcu (vključno s kontrolami) ne sme preseči 10 %. Smrtnost pri nobeni ponovitvi ne sme preseči treh paglavcev, sicer se ponovitev šteje za ogroženo;

(2) za analizo morata biti na voljo vsaj dve stopnji tretiranja, pri čemer so vse štiri ponovitve neogrožene;

(3) za analizo morata biti na voljo vsaj dve stopnji tretiranja brez očitne strupenosti;

veljaven poskus v zvezi s pozitivnim preskusom za aktivnost ščitnice:

(1) v kontrolni skupini sta lahko največ dva smrtna primera paglavcev na ponovitev.

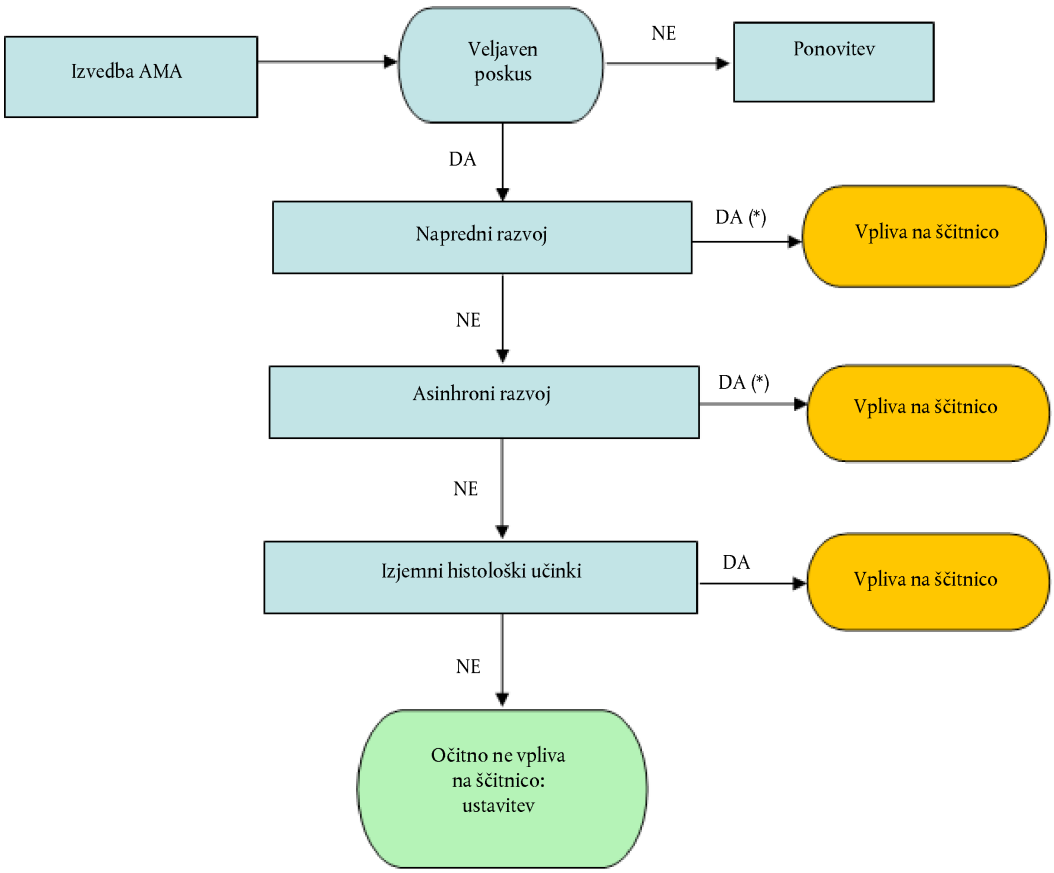
Način odločanja za izvedbo AMA

46. Način odločanja za AMA je bil pripravljen za zagotovitev smiselne pomoči pri izvedbi in razlagi rezultatov biološkega preskusa (glej tabelo poteka na sliki 3). Način odločanja v bistvu obravnava končne točke v navedenem naprednem razvoju, asinhroni razvoj in histopatologija ščitnice se obravnavata podrobno, zakasneli razvoj, dolžina od ust do zadnjične odprtine, teža mokrega telesa in parametri, na katere bi lahko vplivala splošna strupenost, pa se obravnavajo manj podrobno.

▼**M6**

Slika 3

Način odločanja za izvedbo AMA



(*) Nekateri regulativni organi lahko zahtevajo histologijo kljub bistvenim razlikam v naprednem in asinhronem razvoju. Spodbuja se, da se subjekt, ki izvaja ta preskus, pred izvedbo preskusa posvetuje z ustreznimi organi, da določi, katere končne točke so potrebne.

Napredni razvoj (določen z uporabo razvojne faze, SVL in HLL)

47. Znano je le, da se napredni razvoj pojavi zaradi učinkov, ki so povezani s ščitničnim hormonom. To so lahko učinki perifernega tkiva, kot je neposredna interakcija z receptorjem ščitničnega hormona (kot je s T4) ali učinki, ki spreminjajo ravni kroženja ščitničnega hormona. V vsakem primeru se to šteje za ustrezen dokaz, da je kemikalija povezana z aktivnostjo ščitnice. Napredni razvoj se oceni na enega od dveh načinov. Prvič, splošna faza razvoja se lahko oceni s standardiziranim pristopom, kot sta ga opisala Nieuwkoop in Faber (8). Drugič, kvantificirajo se lahko specifične morfološke značilnosti, kot je dolžina zadnjega kraka na 7. in 21. dan, kar je pozitivno povezano z agonističnimi učinki na receptor ščitničnega hormona. Če se pojavi statistično značilen napredek pri razvoju ali dolžini zadnjega kraka, preskus kaže, da kemikalija vpliva na ščitnico.

▼**M6**

48. Ocenjevanje prisotnosti pospešenega razvoja pri preskusnih živalih glede na kontrolno populacijo bo temeljilo na rezultatih statističnih analiz, izvedenih za naslednje štiri končne točke:

— dolžina zadnjega kraka (normalizirana s SVL) na 7. dan študije,

— dolžina zadnjega kraka (normalizirana s SVL) na 21. dan študije,

— razvojna faza na 7. dan študije,

— razvojna faza na 21. dan študije.

49. Statistične analize dolžine zadnjega kraka je treba izvesti na podlagi meritev dolžine zadnjega levega kraka. Dolžina zadnjega kraka se normalizira z razmerjem med dolžino zadnjega kraka in dolžino od ust do zadnjične odprtine posameznega osebka. Nato se primerja sredina normaliziranih vrednosti posamezne stopnje tretiranja. Pospešen razvoj se nato kaže z znatnim povečanjem srednje dolžine zadnjega kraka (normalizirane) v kemično obdelani skupini v primerjavi s kontrolno skupino na 7. dan študije in/ali 21. dan študije (glej Dodatek 3).

50. Statistične analize razvojne faze je treba izvesti na podlagi določitve razvojne faze v skladu z morfološkimi merili, ki sta jih opisala Nieuwkoop in Faber (8). Pospešen razvoj se kaže, če se na 7. in/ali 21. dan študije v primerjavi s kontrolno skupino z večkvantno analizo zazna znatno povečanje vrednosti, povezanih z razvojno fazo, v kemično obdelani skupini.

51. Pri preskusni metodi AMA se znaten učinek na katero koli od navedenih štirih končnih točk šteje kot ustrezen za zaznavo pospešenega razvoja. To pomeni, da znatnih učinkov na dolžino zadnjega kraka ob določeni časovni točki ni treba potrditi z znatnimi učinki na dolžino zadnjega kraka ob drugem času ali z znatnimi učinki na razvojno fazo ob tej določeni časovni točki. Znatnih učinkov na razvojno fazo ob določeni časovni točki pa ni treba potrditi z znatnimi učinki na razvojno fazo ob drugem času ali z znatnimi učinki na dolžino zadnjega kraka ob tej določeni časovni točki. Pomen dokazov pospešenega razvoja se bo kljub temu povečal, če bodo znatni učinki zaznani pri več kot eni končni točki.

Asinhroni razvoj (določen z merili za razvojno fazo)

52. Za asinhroni razvoj je značilna motnja relativnega časa morfogeneze ali razvoja različnih tkiv pri enem paglavcu. Nezmožnost jasne določitve razvojne faze organizma s skupino morfoloških končnih točk, ki se štejejo kot značilne za katero koli fazo, kaže, da se tkiva pri preobrazbi razvijajo asinhrono. Asinhroni razvoj je kazalnik aktivnosti ščitnice. Edini znani načini delovanja, ki povzročajo asinhroni razvoj, so učinki kemikalij na periferno delovanje ščitničnega hormona in/ali metabolizem ščitničnega hormona pri razvijajočih se tkivih, kot je ugotovljen pri inhibitorjih dejodaze.

▼**M6**

53. Ocenjevanje prisotnosti asinhronega razvoja pri preskusnih živalih glede na kontrolno populacijo bo temeljil na splošni morfološki oceni preskusnih živali na 7. in 21. dan študije.

54. Opis normalnega razvoja *Xenopus laevis*, ki sta ga pripravila Nieuwkoop in Faber (8), zagotavlja okvir za opredelitev zaporedja normalnega preoblikovanja tkiva. Izraz „asinhroni razvoj“ se nanaša izrecno na tista odstopanja v splošnem morfološkem razvoju paglavcev, ki preprečujejo dokončno določitev razvojne faze v skladu z Nieuwkoopovimi in Faberjevimi merili (8), ker ključni morfološki znaki kažejo značilnosti različnih faz.

55. Kot nakazuje izraz „asinhroni razvoj“, je treba obravnavati le primere, ki kažejo odstopanja v napredovanju preoblikovanja posebnih tkiv glede na napredovanje preoblikovanja drugih tkiv. Nekateri klasični fenotipi vključujejo zakasnitev ali odsotnost razvoja sprednjega kraka kljub normalnemu ali naprednemu razvoju zadnjih krakov ali repnih tkiv ali zgodnjo resorpcijo škrg glede na fazo morfogeneze zadnjih krakov in resorpcije repa. Da žival kaže asinhroni razvoj, se zabeleži, če ji ni mogoče dodeliti faze, ker ne izpolnjujejo večine pomembnih razvojnih meril za dano fazo po Nieuwkoopu in Faberju (8) ali če obstaja izjemna zakasnitev ali pospešitev ene ali več ključnih značilnosti (npr. popolna resorpcija repa, ko še ni sprednjih krakov). Ta ocena se izvede kvalitativno in mora zajemati pregled vseh pomembnih značilnosti, ki sta jih navedla Nieuwkoop in Faber (8). Pri tem pa ni treba zabeležiti stanja razvoja različnih pomembnih značilnosti opazovanih živali. Živalim, pri katerih je zabeleženo, da kažejo asinhroni razvoj, se ne dodeli razvojna faza po Nieuwkoopu in Faberju (8).

56. Zato je glavno merilo, da se primeri nenormalnega morfološkega razvoja označijo kot „asinhroni razvoj“, motnja relativnega časa preoblikovanja tkiva in morfogeneze tkiva, medtem ko morfologija prizadetih tkiv ni očitno nenormalna. Primer prikaza razlage splošnih morfoloških nenormalnosti je, da bo zadržana morfogeneza zadnjega kraka glede na razvoj drugih tkiv izpolnila merilo „asinhronega razvoja“, medtem ko se primeri manjkajočih zadnjih krakov, nenormalnih števil (npr. ektrodaktilija in polidaktilija) ali drugih očitnih deformnosti krakov ne smejo šteti za „asinhroni razvoj“.

57. V zvezi s tem morajo pomembni morfološki znaki, katerih usklajen metamorfni napredek je treba oceniti, vključevati morfogenezo zadnjih krakov, morfogenezo sprednjih krakov, pojav sprednjih krakov, fazo resorpcije repa (zlasti resorpcijo repne plavuti) in morfologijo glave (npr. velikost škrg, fazo resorpcije škrg, morfologijo spodnje čeljusti in protruzijo Mecklovega hrustanca).

58. Glede na različne načine kemijskega delovanja se lahko pojavijo različni splošni morfološki fenotipi. Nekateri klasični fenotipi vključujejo zakasnitev ali odsotnost razvoja sprednjega kraka kljub normalnemu ali naprednemu razvoju zadnjih krakov ali repnih tkiv, zgodnji resorpciji škrg glede na zadnje krake in preoblikovanju repa.

▼M6

Histopatologija

59. Če kemikalija ne povzroča očitne strupenosti in ne pospešuje razvoja ali povzroča asinhronega razvoja, se histopatologija ščitnične žleze oceni na podlagi ustrezne smernice (9). Razvojna zaostalost, kadar ni strupenosti, je pomemben kazalnik protiščitničnega delovanja, vendar je analiza razvojne faze manj občutljiva in manj diagnostična kot histopatološka analiza ščitnične žleze. Zato je v tem primeru treba izvajati histopatološke analize ščitničnih žlez. V odsotnosti razvojnih učinkov so bili dokazani učinki na histologijo ščitnične žleze. Če se histopatologija ščitnice spremeni, se šteje, da kemikalija vpliva na ščitnico. Če v ščitničnih žlezah ni ugotovljen zakasnjeni razvoj ali histološke lezije, se šteje, da kemikalija ne vpliva na ščitnico. Ta odločitev se utemelji s tem, da na ščitnično žlezo vpliva TSH, pri čemer bodo vse kemikalije, ki kroženje ščitničnega hormona spremenijo dovolj, da se spremeni sekrecija TSH, povzročile histopatološke spremembe ščitničnih žlez. Kroženje ščitničnega hormona se lahko spremeni zaradi različnih načinov in mehanizmov delovanja. Čeprav raven ščitničnega hormona kaže na učinek, ki je povezan s ščitnico, to ni dovolj za določitev, kateri način ali mehanizem delovanja je povezan z odzivom.

60. Ker ta končna točka ni primerna za osnovne statistične pristope, je treba učinek, povezan z izpostavljenostjo kemikaliji, določiti s strokovnim mnenjem patologa.

Zakasneli razvoj (določen z uporabo razvojne faze, HLL, BW in SVL)

61. Zakasneli razvoj lahko povzročijo protiščitnični mehanizmi in posredna strupenost. Verjetno je, da zmeren zakasneli razvoj in očitni znaki strupenosti kažejo nespecifičen strupeni učinek. Ocenjevanje neščitnične strupenosti je bistven del preskusa, da se zmanjša verjetnost lažno pozitivnih rezultatov. Čezmerna smrtnost je jasen znak, da se pojavljajo drugi strupeni mehanizmi. Zmerna zmanjšanja rasti, kot so določena z mokro težo in/ali dolžino od ust do zadnjične odprtine, podobno kažejo neščitnično strupenost. Očitna povečanja rasti se pogosto ugotovijo pri kemikalijah, ki negativno vplivajo na normalen razvoj. Zato prisotnost večjih živali še ne pomeni neščitnične strupenosti. Vendar se pri določanju ščitnične strupenosti ne sme nikoli zanašati izključno na rast. Za določanje delovanja ščitnice je treba uporabiti rast skupaj z razvojno fazo in histopatologijo ščitnice. Pri določanju očitne strupenosti je treba obravnavati tudi druge končne točke, vključno z edemi, hemoragičnimi lezijami, letargijo, manjšo porabo hrane, neenakomernim/spremenjenim načinom plavanja itd. Če vse preskusne koncentracije kažejo znake očitne strupenosti, je treba preskusno kemikalijo ponovno oceniti pri nižjih preskusnih koncentracijah, preden se določi, ali bi lahko vplivala na ščitnico ali ne.

62. Statistično značilen zakasneli razvoj, kadar ni drugih znakov očitne strupenosti, kaže, da kemikalija vpliva na ščitnico (antagonistično). Kadar ni pomembnih statističnih odzivov, se lahko ta rezultat popravi z rezultati histopatologije ščitnice.

▼M6

Statistične analize

63. Priporoča se, da se pri statističnih analizah podatkov upoštevajo postopki, opisani v dokumentu Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernica za uporabo (11). Za vse stalne kvantitativne končne točke (HLL, SVL, mokra teža), skladne z monotonim odzivom na odmerek, je treba za vzpostavitev znatnega učinka tretiranja na regresiven način uporabiti preskus po Jonckheere-Terpstraju.

64. Za stalne končne točke, ki niso skladne z monotonim odzivom na odmerek, je treba pri podatkih oceniti normalnost (priporoča se uporaba Shapiro-Wilkovega ali Anderson-Darlingovega preskusa) in homogenost varianc (priporoča se uporaba Levenejevega preskusa). Oba preskusa se izvedeta na ostankih iz analize variance. Namesto formalnih preskusov za normalnost in homogenost varianc se lahko uporabi strokovna presoja, čeprav se priporoča uporaba formalnih preskusov. Če je ugotovljena nenormalnost ali heterogenost varianc, je treba poiskati normalizacijsko pretvorbo, ki stabilizira variance. Če so podatki (morda po pretvorbi) normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc, se znaten učinek tretiranja določi na podlagi Dunnettovega preskusa. Če so podatki (morda po pretvorbi) normalno porazdeljeni s heterogenostjo varianc, se znaten učinek tretiranja določi na podlagi Tamhane-Dunnettovega preskusa, preskusa T3 ali Mann-Whitney-Wilcoxonovega U-preskusa. Kadar ni mogoče najti normalizacijske pretvorbe, se znaten učinek tretiranja določi na podlagi Mann-Whitney-Wilcoxonovega U-preskusa in Bonferroni-Holmove prilagoditve vrednostim p. Dunnettov preskus se uporablja neodvisno od katerega koli F-preskusa analize variance, Mann-Whitneyjev preskus pa se uporablja neodvisno od katerega koli Kruskall-Wallisovega preskusa.

65. Visoka smrtnost ni pričakovana, vendar jo je treba oceniti na podlagi regresivnega Cochran-Armitageovega preskusa, kadar so podatki skladni z monotonostjo odziva na odmerek, sicer pa na podlagi Fisherjevega eksaktnega preskusa z Bonferroni-Holmovo prilagoditvijo.

66. Znaten učinek tretiranja za razvojno stopnjo se določi na podlagi regresivne uporabe preskusa po Jonckheere-Terpstraju, ki se uporablja za mediane ponovitev. Namesto tega je treba za določitev učinka uporabiti večkvantni Jonckheerov preskus od 20. do 80. centila, kar je tudi priporočljivo, ker upošteva spremembe profila porazdelitve.

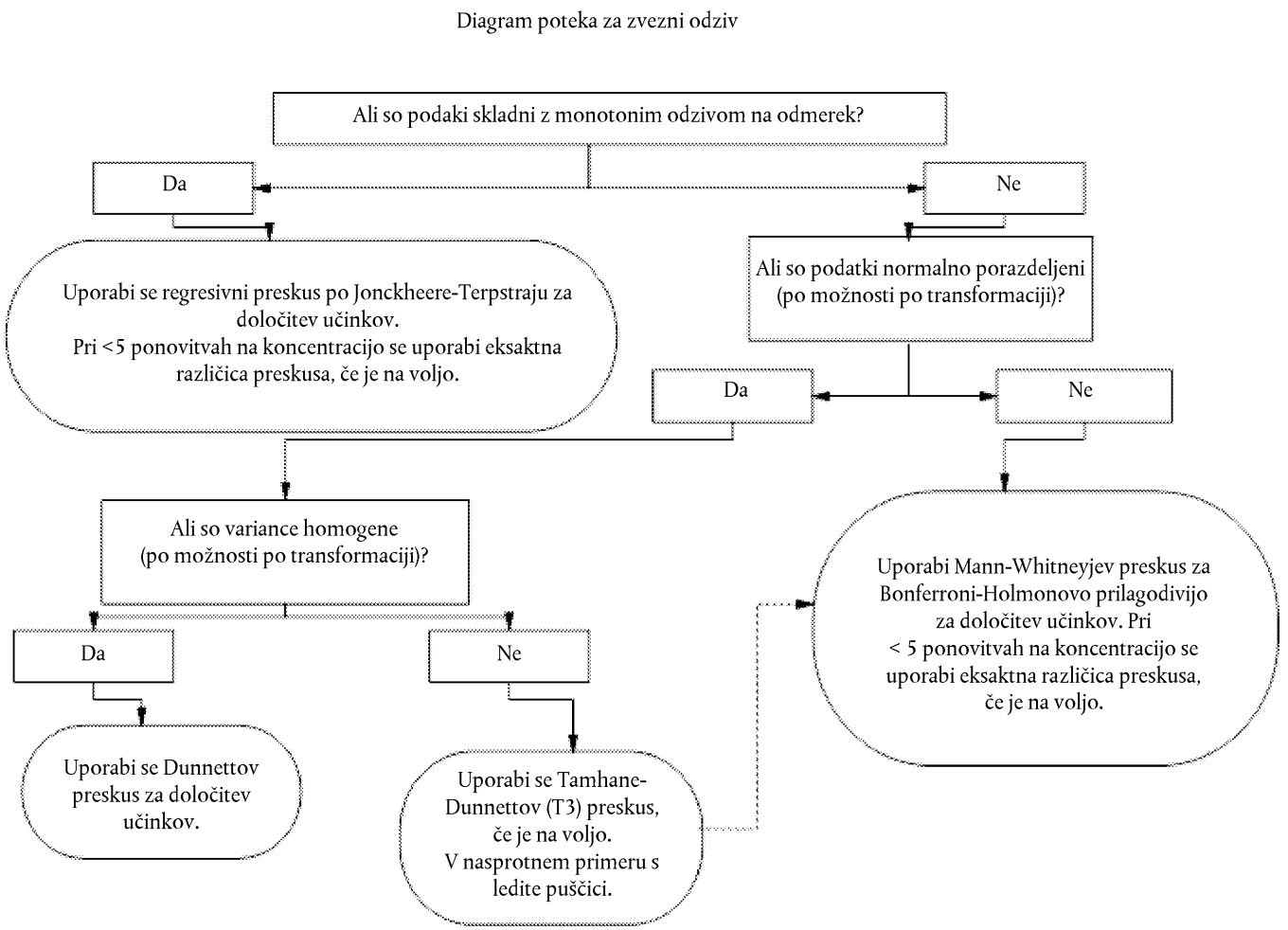
67. Ustrezna enota analize je ponovitev, da podatke sestavljajo mediane ponovitev, če se uporablja preskus po Jonckheere-Terpstraju ali Mann-Whitneyjev U-preskus, ali ponovljena srednja vrednost, če se uporablja Dunnettov preskus. Monotonost odziva na odmerek se lahko oceni vizualno na podlagi ponovitve in sredin tretiranj ali na podlagi formalnih preskusov, kot so opisani zgoraj (11). Pri manj kot petih ponovitvah na tretirani vzorec ali kontrolo je treba uporabiti točne različice permutacije preskusa po Jonckheere-Terpstraju in Mann-Whitneyevega preskusa, če so na voljo. Statistična značilnost vseh navedenih preskusov je ocenjena na raven značilnosti 0,05.

68. Slika 4 je diagram poteka za izvedbo statističnih preskusov stalnih podatkov.

▼M6

Slika 4

Diagram poteka za statistične pristope za podatke o zveznem odzivu.



▼M6

Posebni pomisleki o analizi podatkov

Uporaba ogroženih stopenj tretiranja

69. Pri določanju, ali se očitna strupenost kaže s ponovitvijo ali celotnim tretiranjem, se obravnava več dejavnikov, ki jih je treba izključiti iz analize. Očitna strupenost je opredeljena kot več kot dva smrtna primera v kateri koli ponovitvi, ki ju je mogoče pojasniti le s strupenostjo in ne s tehnično napako. Drugi znaki očitne strupenosti vključujejo hemoragijo, nenormalno obnašanje, nenormalne načine plavanja, anoreksijo in vse druge klinične znake bolezni. Za subletalne znake strupenosti bodo lahko potrebne kvalitativne ocene, ki jih je vedno treba izvesti za kontrolno skupino s čisto vodo.

Kontrole s topilom

70. Uporabo topila je treba obravnavati le kot zadnjo možnost, ko so bile obravnavane že vse druge možnosti dovajanja kemikalije. Če se uporabi topilo, je treba skladno izvesti kontrolo s čisto vodo. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih učinkov topila. Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine s čisto vodo. Najpomembnejše končne točke, ki jih je v tej analizi treba obravnavati, so razvojna faza, dolžina od ust do zadnjične odprtine in mokra teža, ker lahko nanje vpliva strupenost, ki ne vpliva na ščitnico. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino s čisto vodo in kontrolno skupino s topilom, je treba končne točke študije za merila odziva določiti s kontrolo s čisto vodo. Če za nobeno izmerjeno spremenljivko odziva ni statistično značilne razlike med kontrolo s čisto vodo in kontrolo s topilom, je treba končne točke študije za merila odziva določiti z združenimi kontrolami z vodo za redčenje in topilom.

Tretirane skupine, ki dosežejo 60. razvojno fazo ali več

71. Po 60. fazi se velikost in teža paglavcev zmanjšata zaradi resorpcije in zmanjšanja absolutne vsebnosti vode. Zato meritev mokre teže in dolžine od ust do zadnjične odprtine v statističnih analizah ni mogoče ustrezno uporabiti za razlike v hitrostih rasti. Podatke o mokri teži in dolžini organizmov, ki so presegli 60. fazo po Nieuwkoopu in Faberju, je treba izključiti in se jih ne sme uporabiti pri analizah sredin ponovitev ali median ponovitev. Za analizo teh parametrov, povezanih z rastjo, se lahko uporabita dva različna pristopa.

72. Prvi pristop je, da se za statistično analizo mokre teže in/ali dolžine od ust do zadnjične odprtine obravnavajo le paglavci, katerih razvojna faza je nižja ali enaka 60. fazi. S tem pristopom naj bi se zagotovile ustrezno zanesljive informacije o resnosti možnih učinkov na rast, če se iz analiz umakne le majhen del preskusnih živali ($\leq$ 20 %). Če večje število paglavcev v eni ali več nominalnih koncentracijah kaže razvojno fazo, višjo od 60. ($\geq$ 20 %), je treba pri vseh paglavcih opraviti dvofaktorsko analizo variance in ugnezdeno strukturo variance, da se ocenijo učinki na rast zaradi kemične obdelave, pri čemer se upošteva učinek pozne razvojne faze na rast. V Dodatku 3 so navedene smernice za analizo teže in dolžine z dvofaktorsko analizo variance.

LITERATURA

(1) OECD (2004). Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Pariz.

▼**M6**

(2) OECD (2007). Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Pariz.

(3) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Pariz.

(4) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Pariz.

(5) ASTM (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729–96(2002), Filadelfija, PA.

(6) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439–98.

(7) Kahl, M. D., Russom, C. L., DeFoe, D. L., in Hammermeister, D. E. (1999). Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, str. 539–551.

(8) Nieuwkoop, P. D., in Faber, J. (1994). Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York.

(9) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Pariz.

(10) Dodd, M. H. I., in Dodd, J. M. (1976). Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ur.), Academic Press, New York, str. 467–599.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Pariz.

(12) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D. B. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; str. 69–92.

▼M6

Dodatek 1

Tabela 1

Poskusni pogoji za 21-dnevni preskus preobrazbe dvoživk

Preskusna žival		Ličinka *Xenopus laevis*	
Začetna faza ličinke		51. faza po Nieuwkoopu in Faberju	
Obdobje izpostavljenosti		21 dni	
Merila za izbiro ličink		razvojna faza in celotna dolžina (neobvezno)	
Preskusne koncentracije		najmanj 3 koncentracije v približno enem redu velikosti	
Režim izpostavljenosti		pretočni (priporočen) in/ali s statičnim obnavljanjem	
Pretok preskusnega sistema		25 ml/min (prostornina se v celoti zamenja približno vsake 2,7 ure)	
Primarne končne točke/dnevi določitve		smrtnost	vsak dan
		razvojna faza	7. in 21. dan
		dolžina zadnjega kraka	7. in 21. dan
		dolžina od ust do zadnjične odprtine	7. in 21. dan
		teža mokrega telesa	7. in 21. dan
		histologija ščitnice	21. dan
Voda za redčenje/laboratorijska kontrola		deklorirana vodovodna voda (prečiščena z ogljem) ali enakovreden laboratorijski vir	
Gostota ličink		20 ličink/preskusno posodo (5/l)	
Preskusna raztopina/preskusna posoda		4–10 l (najmanj 10–15 cm vode)/stekleno preskusno posodo ali preskusno posodo iz nerjavnega jekla (npr. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Ponovitev		4 ponovitvene preskusne posode/preskusno koncentracijo in kontrolo	
Sprejemljiva stopnja smrtnosti v kontrolah		≤ 10 % na ponovitveno preskusno posodo	
Fiksiranje žleze	Število fiksiranih	vsi paglavci (najprej se jih oceni 5/ponovitev)	
	Regija	glava ali celo telo	
	Fiksacijska tekočina	Davidsonov fiksativ	
Hranjenje	Hrana	Sera Micron® ali enakovredna	
	Količina/pogostost	za način hranjenja s Sera Micron® glej tabelo 1	
Osvetlitev	Obdobje osvetljenosti	12 h svetlobe: 12 h teme:	

▼**M6**

	Jakost	600 do 2 000 luksov (izmerjeno na vodni gladini)
Temperatura vode		22 °C ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Koncentracija raztopljenega kisika (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % nasičenosti z zrakom)
Časovni razpored vzorčenja za analitično kemijo		enkrat/teden (4 vzorčenja/preskus)

▼M6

Dodatek 2

Tabele za poročanje za neobdelane podatke in povzete podatke

Tabela 1

Splošne informacije o preskusni kemikaliji

Kemijske informacije			
	Vnesite preskusno kemikalijo, enote koncentracije in tretiranja		
	Preskusna kemikalija:		
	Enote koncentracije:		
	Tretiranje 1		
	Tretiranje 2		
	Tretiranje 3		
	Tretiranje 4		
	Datum (dan 0):		Vnesite datum (mm/dd/ll)
	Datum (7. dan):		Vnesite datum (mm/dd/ll)
	Datum (21. dan):		Vnesite datum (mm/dd/ll)

Tabela 2

Zbirni listi za neobdelane podatke za 7. in 21. dan

DAN X
DATUM 00/00/00

	Koncentracija	Številka tretiranja	Številka ponovitve	Številka osebka	Označba osebka	Razvojna faza	Dolžina SVL (mm)	Dolžina zadnjega kraka (mm)	Mokra teža celotnega organizma (mg)
VRSTICA	TRET.	ŠT: TRET.	PON.	ŠT. OS.	OZN. OS.	FAZA	BL	HLL	TEŽA
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Koncentra-cija	Številka tretiranja	Številka ponovitve	Številka osebka	Označba osebka	Razvojna faza	Dolžina SVL (mm)	Dolžina zadnjega kraka (mm)	Mokra teža celotnega organizma (mg)
VRSTI-CA	TRET.	ŠT: TRET.	PON.	ŠT. OS.	OZN. OS.	FAZA	BL	HLL	TEŽA
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Koncentra-cija	Številka tretiranja	Številka ponovitve	Številka osebka	Označba osebka	Razvojna faza	Dolžina SVL (mm)	Dolžina zadnjega kraka (mm)	Mokra teža celotnega organizma (mg)
VRSTI-CA	TRET.	ŠT: TRET.	PON.	ŠT. OS.	OZN. OS.	FAZA	BL	HLL	TEŽA
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Koncentra-cija	Številka tretiranja	Številka ponovitve	Številka osebka	Označba osebka	Razvojna faza	Dolžina SVL (mm)	Dolžina zadnjega kraka (mm)	Mokra teža celotnega organizma (mg)
VRSTI-CA	TRET.	ŠT: TRET.	PON.	ŠT. OS.	OZN. OS.	FAZA	BL	HLL	TEŽA
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tabela 3

Izračunani povzeti podatki o končnih točkah za 7. in 21. dan

		Razvojna faza			SVL (mm)		Dolžina zadnjega kraka (mm)		Teža (mg)	
TRET.	PON.	MIN	MEDIANA	MAKS	SREDINA	ST. ODKL.	SREDINA	ST. ODKL.	SREDINA	ST. ODKL.
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Opomba: Izračuni v celicah so povezani z vnesenimi podatki iz tabele 2.

Tabela 4

Podatki o dnevni smrtnosti

Dan preskusa	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Dan preskusa	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Število ponovitev		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Število tretiranj		0				0				0				0			

Opomba: Izračuni v celicah so povezani z vnesenimi podatki iz tabele 1.

Tabela 5

Merila kakovosti vode

Sistem izpostavljenosti (pretočni/s statičnim obnavljanjem)
Temperatura:
Jakost svetlobe:
Cikel svetlobe in teme:
Hrana:
Stopnja hranjenja:
pH vode:
Koncentracija jodida v preskusni vodi:

▼**M6**

Tabela 6

Povzetek kemičnih podatkov

Kemijsko ime:																					
Številka CAS:																					
Dan preskusa	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Opomba: Izračuni v celicah so povezani z vnesenimi podatki iz tabele 1.

▼**M6**

Tabela 7

Tabele za histopatološko poročanje za glavna merila

Datum: Kemikalija: Patolog:

Oznaka kontrolne živali – ponovitev 1	Oznaka kontrolne živali – ponovitev 2	Hipertrofija ščitnične žleze	Atrofija ščitnične žleze	Hipertrofija folikularnih celic	Hiperplazija folikularnih celic
Skupaj:					

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1	Oznaka preskusne živali – ponovitev 2	Hipertrofija ščitnične žleze	Atrofija ščitnične žleze	Hipertrofija folikularnih celic	Hiperplazija folikularnih celic
Skupaj:					

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1	Oznaka preskusne živali – ponovitev 2	Hipertrofija ščitnične žleze	Atrofija ščitnične žleze	Hipertrofija folikularnih celic	Hiperplazija folikularnih celic
Skupaj:					

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1	Oznaka preskusne živali – ponovitev 2	Hipertrofija ščitnične žleze	Atrofija ščitnične žleze	Hipertrofija folikularnih celic	Hiperplazija folikularnih celic
Skupaj:					

▼**M6**

Tabela 8

Dodatna histopatološka merila

Datum: Kemikalija: Patolog:

Oznaka kontrolne živali – ponovitev 1	Oznaka kontrolne živali – ponovitev 2	Povečanje območja svetline folikla	Zmanjšanje območja svetline folikla
Skupaj:			

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1	Oznaka preskusne živali – ponovitev 2	Povečanje območja svetline folikla	Zmanjšanje območja svetline folikla
Skupaj:			

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1	Oznaka preskusne živali – ponovitev 2	Povečanje območja svetline folikla	Zmanjšanje območja svetline folikla
Skupaj:			

▼**M6**

Tabela 9

Pripovedni opisi histopatoloških ugotovitev

Datum:

Kemikalija:

Patolog:

		Pripovedni opis
Oznaka kontrolne živali – ponovitev 1		
Oznaka kontrolne živali – ponovitev 2		
Oznaka preskusne živali – ponovitev 1		
Oznaka preskusne živali – ponovitev 2		

▼**M6**

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1		
Oznaka preskusne živali – ponovitev 2		

Oznaka preskusne živali – ponovitev 1		
Oznaka preskusne živali – ponovitev 2		

▼M6

Tabela 10

Predloga tabele za poročanje za povzetke za dan x (7. ali 21. dan) AMA

		Kontrola				Odmerek 1					Odmerek 2					Odmerek 3				
Končna točka	Ponovitev	Sredina	SO	KV	Š	Sredina	SO	KV	Š	Vred-nost p	Sredina	SO	KV	Š	Vred-nost p	Sredina	SO	KV	Š	Vred-nost p
Zadnji krak Dolžina (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Sredina:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Sredina:																			
Mokra teža (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Sredina:																			

▼M6

Tabela 11

Tabela za poročanje za povzetke za dan × (7. ali 21. dan) AMA

		Kontrola				Odmerek 1					Odmerek 2					Odmerek 3				
	Ponovitev	Mediana	Min.	Maks.	Š	Mediana	Min.	Maks.	Š	Vrednost p	Mediana	Min.	Maks.	Š	Vrednost p	Mediana	Min.	Maks.	Mediana	Vrednost p
Razvojna faza	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Sredina:																			

▼M6

Dodatek 3

Alternativna analiza teže in dolžine, kadar je razvojna faza pozna pri več kot 20 % paglavcev v eni koncentraciji ali več

Če večje število paglavcev v eni ali več nominalnih koncentracijah kaže razvojno fazo, višjo od 60. (≥ 20 %), je treba pri vseh paglavcih opraviti dvofaktorsko analizo variance in ugnezdeno strukturo variance, da se ocenijo učinki na rast zaradi kemične obdelave, pri čemer se upošteva učinek pozne razvojne faze na rast.

Priporoča se uporaba vseh podatkov, vendar je treba upoštevati učinek pozne razvojne faze. To omogoča dvofaktorska analiza variance z ugnezdeno strukturo variance. Če je razvojna faza živali 61. ali višja, je treba za pozno fazo izbrati „da“ (LateStage = „Yes“). V nasprotnem primeru je treba izbrati „ne“ (LateStage = „No“). Nato se lahko izvede dvofaktorska analiza variance s koncentracijo in LateStage ter njuno povezanostjo, pri čemer je Rep(Conc) naključni faktor, Tadpole(Rep) pa še en naključni učinek. Ponovitev se še vedno obravnava kot enota analize in zagotavlja v glavnem enake rezultate kot tehtana analiza sredin rep*latestage, tehtana s številom živali na sredino. Če podatki ne upoštevajo zahtev analize variance glede normalnosti ali homogenosti varianc, se lahko izvede pretvorba normalizirane porazdelitve, v čimer se odstrani navedena ovira.

Poleg standardnih F-preskusov analize variance za učinke Conc, LateStage in njihovih povezanosti se lahko interakcijski F-preskus razdeli na dva dodatna F-preskusa analize variance, pri čemer se en uporablja za srednje odzive pri koncentracijah za LateStage=„No“, drugi pa za srednje odzive pri koncentracijah za LateStage = „Yes“. Dodatne primerjave sredin tretiranj glede na kontrolo se izvedejo v vsaki fazi LateStage. Izvedejo se lahko analize trenda z ustreznimi nasprotji ali enostavne primerjave parov, če obstajajo dokazi nemonotonega odziva na odmerek v okviru ene stopnje spremenljivke LateStage. Bonferroni-Holmova prilagoditev vrednostim p se izvede le, če ustrezen F-del ni pomemben. To se lahko naredi v SAS in predvidoma v drugih statističnih programskih paketih. Zapleti se lahko pojavijo, če v nekaterih koncentracijah ni živali v pozni fazi, vendar se lahko ti primeri rešijo neposredno.

▼**M6**

Dodatek 4

Opredelitve

Kemikalija: snov ali zmes.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

▼M6

C.39 **PRESKUS RAZMNOŽEVANJA SKAKAČEV V TLEH**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 232 (2009). Zasnovana je za ocenjevanje učinkov kemikalij na sposobnost razmnoževanja skakačev v tleh. Temelji na obstoječih postopkih (1) (2). Partenogenetska *Folsomia candida* in *Folsomia fimetaria*, ki se razmnožujeta spolno, sta dve najbolj razširjeni vrsti skakačev, ki sta primerni za gojenje in komercialno dostopni. Kadar je treba oceniti posebne habitate, kjer ni teh vrst, se lahko postopek razširi tudi na druge vrste skakačev, če lahko izpolnijo merila za veljavnost preskusa.

2. Talni skakači so ekološko pomembna vrsta za ekotoksikološko preskušanje. Skakači so šesteronožci s tankim zunanjim skeletom, ki je zelo prepusten za zrak in vodo, ter predstavljajo vrsto členonožcev z drugačnim načinom in stopnjo izpostavljenosti kot deževniki in enhitreji.

3. Gostote populacije skakačev običajno dosežejo 10^5 m^{-2} v tleh in plasteh preperelega listja v več kopenskih ekosistemih (3) (4). Odrasli običajno merijo 0,5–5 mm, njihov prispevek k skupni živalski biomasi in dihanju tal pa je nizek in ocenjen na 1–5 % (5). Njihova najpomembnejša vloga bi zato lahko bila potencialno reguliranje procesov z mikrobivorizmom in plenjenjem mikrofavne. Skakači so plen za številne endogeične in epigeične nevretenčarje, kot so pršice, strige, pajki, krešiči in kratkokrilci. Skakači prispevajo k procesom razpadanja v kislih tleh, kjer bi lahko bili najpomembnejši talni nevretenčarji poleg enhitrejev, ker tam običajno ni deževnikov in dvojnonog.

4. *F. fimetaria* se nahaja po vsem svetu in je pogosto v različnih vrstah tal od peščenih do ilovnatih in od humusa do trhline. Je skakač, ki nima oči in pigmenta. Najden je bil v kmetijskih tleh po vsej Evropi (6). Je vsejed in se med drugim prehranjuje z mikroorganizmi *fungus hypha*, bakterijami, praživalmi in odpadki. Njegova interakcija poteka prek paše z infekcijami patogenih gliv (7) in lahko vpliva na mikorizo, kot je znano za *F. candida*. Tako kot večina vrst skakačev se razmnožuje spolno, pri čemer morajo biti samci stalno prisotni zaradi oploditve jajčec.

5. Tudi *F. candida* se nahaja povsod po svetu. Čeprav običajno ni prisotna v večini naravnih tal, se v večjem številu pogosto nahaja v tleh, bogatih s humusom. Je skakač, ki nima oči in pigmenta. Ima dobro razvito furko (skakalni organ), se aktivno premika s tekom in takoj skoči, če je ogrožen. Ekološka vloga *F. candida* je podobna vlogi *F. fimetaria*, vendar so njen habitat organsko bogatejša tla. Razmnožuje se partenogenetsko. Samcev je manj kot eden na tisoč.

NAČELO PRESKUSA

6. Sinhroni odrasli (*F. fimetaria*) ali mladi (*F. candida*) skakači so izpostavljeni različnim koncentracijam preskusne kemikalije, premešane v spremenjena umetna tla (8) s 5-odstotno vsebnostjo organske snovi (ali alternativna tla). Potek preskusa se lahko razdeli na dva koraka:

— preskus za določanje območja delovanja, če ni na voljo ustreznih informacij o strupenosti, v katerem sta smrtnost in razmnoževanje glavni

▼M6

končni točki, ki se ocenjujeta po dveh tednih za *F. fimetaria* in treh tednih za *F. candida*,

— končni preskus razmnoževanja, v katerem se ocenjujeta skupno število mladičev, ki so jih ustvarili starši, in preživetje staršev. Ta končni preskus traja tri tedne za *F. fimetaria* ali štiri tedne za *F. candida*.

Strupeni učinek preskusne kemikalije na smrtnost odraslih in njihovo sposobnost razmnoževanja se izrazi kot LC_x in EC_x s prilagajanjem podatkov ustreznemu modelu z nelinearno regresijo, da se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno smrtnost ali manjšo sposobnost razmnoževanja, ali pa kot vrednost NOEC/LOEC (9).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

7. Priporočljivo je, da so znane fizikalne lastnosti, topnost v vodi, log K_{ow}, porazdelitveni koeficient tla/voda in parni tlak preskusne kemikalije. Zaželene so dodatne informacije o končnem stanju preskusne kemikalije v tleh, kot so stopnje fotolize in hidrolize ter biotska razgradnja. Kadar so na voljo kemijska identifikacija preskusne kemikalije v skladu z nomenklaturo IUPAC, številka CAS, serija, skupina, strukturna formula in čistost, jih je treba dokumentirati.

8. Ta preskusna metoda se lahko uporabi za kemikalije, ki so v vodi topne ali netopne. Vendar se bo način uporabe preskusne kemikalije ustrezno razlikoval. Preskusna metoda se ne uporablja za hlapne kemikalije, tj. kemikalije, katerih Henryjeva konstanta ali porazdelitveni koeficient zrak/voda je večji od ena, ali kemikalije, katerih parni tlak presega 0,0133 Pa pri 25 °C.

VELJAVNOST PRESKUSA

9. Da se rezultati preskusa štejejo za veljavne, morajo biti v netretiranih kontrolah izpolnjena naslednja merila:

— srednja smrtnost pri odraslih na koncu preskusa ne sme presegati 20 %,

— povprečno število mladičev na posodo mora biti na koncu preskusa vsaj 100,

— koeficient variacije, izračunan za število mladičev, mora biti na koncu končnega preskusa manj kot 30 %.

REFERENČNA KEMIKALIJA

10. Referenčno kemikalijo je treba preskusiti pri koncentraciji EC_{50} za izbrano vrsto preskusnih tal v rednih časovnih razmikih ali jo po možnosti vključiti v vsak preskusni vzorec, da se preveri, ali je raven odziva preskusnih organizmov v preskusnem sistemu normalna. Ustrezna referenčna kemikalija je borova kemikalija, ki mora razmnoževanje zmanjšati za 50 % (10) (11) pri približno 100 mg/kg suhe teže tal za obe vrsti.

OPIS PRESKUSA

Preskusne posode in oprema

11. Ustrezne preskusne posode so posode, ki lahko zadržujejo 30 g vlažne prsti. Izdelane morajo biti iz stekla ali inertne plastike (nestrupene). Vendar se je treba uporabi plastičnih posod izogibati, če se izpostavljenost preskusni kemikaliji zmanjša zaradi sorpcije. Preskusna posoda mora imeti presečno območje, ki omogoča dejansko globino tal v preskusni

▼M6

posodi od 2 do 4 cm. Posode morajo imeti pokrove (npr. iz stekla ali polietilena), ki so zasnovani za zmanjšanje izhlapevanja vode, medtem ko omogočajo izmenjavo plinov med tlemi in atmosfero. Posoda mora biti vsaj delno prozorna, da omogoča prenos svetlobe.

12. Potrebna je normalna laboratorijska oprema, zlasti:

— sušilnik,

— stereomikroskop,

— merilnik vrednosti pH in merilnik osvetljenosti,

— ustrezne natančne tehtnice,

— ustrezna oprema za uravnavanje temperature,

— ustrezna oprema za uravnavanje vlažnosti zraka (ni nujna, če so posode za izpostavljanje pokrite s pokrovi),

— inkubator z uravnavanjem temperature ali majhen prostor,

— prijemalke ali nizkotlačni sesalnik.

Priprava preskusnih tal

13. Uporabijo se spremenjena umetna tla (8) s 5-odstotno vsebnostjo organske snovi. Če umetna tla niso podobna naravnim, se lahko uporabijo tudi naravna tla. Priporočena sestava umetnih tal je naslednja (na podlagi suhih tež, posušenih na konstantno težo pri 105 °C):

— 5 % šotnega maha, posušenega na zraku in fino mletega (sprejemljiva je velikost delcev 2 ± 1 mm),

— 20 % kaolinske gline (vsebnost kaolinita po možnosti nad 30 %),

— približno 74 % industrijskega peska, posušenega na zraku (odvisno od potrebne količine $CaCO_3$), pretežno finega peska z več kot 50 % delcev med 50 in 200 mikronov. Točna količina peska je odvisna od količine $CaCO_3$ (glej v nadaljevanju), pri čemer morata skupaj predstavljati 75 %,

— 1,0 % kalcijevega karbonata ($CaCO_3$, zdrobljen v prah, analitsko čisti) za zagotovitev pH 6,0 ± 0,5; količina kalcijevega karbonata, ki ga je treba dodati, je lahko odvisna pretežno od kakovosti/vrste šote (glej opombo 1).

Opomba 1: Količina $CaCO_3$, ki je potrebna, bo odvisna od sestavin substrata tal in jo je treba določiti z merjenjem pH predinkubiranih podvzorcev vlažnih tal neposredno pred preskusom.*Opomba 2:* Priporoča se merjenje pH ter po možnosti razmerja C/N, kationske izmenjalne kapacitete (CEC) in vsebnosti organske snovi v tleh, da se omogočita poznejša normalizacija in boljša razlaga rezultatov.*Opomba 3:* Po potrebi se lahko npr. za namene posebnega preskušanja kot preskusni in/ali kulturni substrat uporabijo tudi naravna tla z neonesnaženih območij. Če se uporabijo naravna tla, pa je treba določiti vsaj njihov izvor (mesto odvzema), pH, teksturo (porazdelitev delcev glede na velikost), kationsko izmenjalno kapaciteto in vsebnost organske snovi, pri čemer ne smejo biti onesnažena. Preden se tla uporabijo pri končnem preskusu, je priporočljivo dokazati ustreznost naravnih tal za preskus in izpolnjevanje meril za veljavnost preskusa.

▼M6

14. Suhe sestavine tal se temeljito premešajo (npr. v velikem laboratorijskem mešalniku). Največja zmogljivost zadrževanja vode (WHC) umetnih tal se določi v skladu s postopki iz Dodatka 5. Odstotek vlage v tleh za preskušanje je treba optimirati, da se zagotovi porozna struktura tal, ki skakačem omogoča vstop skozi pore. To je običajno 40–60 % največje zmogljivosti zadrževanja vode.

15. Suha umetna tla se predhodno navlažijo z dodajanjem dovolj deionizirane vode, da se zagotovi približno pol končne vsebnosti vode 2–7 dni pred začetkom preskusa, kar omogoča vzpostavitev ravnotežja/stabilizacijo kislosti. Za določitev pH se uporabi zmes tal in raztopine 1 M kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M kalcijevega klorida ($CaCl_2$) v razmerju 1: 5 (v skladu z Dodatkom 6). Če so tla bolj kisla, kot je potrebno, se lahko prilagodijo z dodajanjem ustrezne količine $CaCO_3$. Če so tla preveč alkalna, se lahko prilagodijo z dodajanjem anorganske kisline, ki ni škodljiva za skakače.

16. Predhodno navlažena tla se razdelijo na dele, ki ustrezajo številu preskusnih koncentracij (in referenčne kemikalije, kadar je primerno) ter kontrol, uporabljenih v preskusu. Dodajanje preskusnih kemikalij in uravnavanje vsebnosti vode potekata v skladu z odstavkom 24.

Izbira in priprava preskusnih živali

17. Priporočena vrsta je partenogena *F. candida*, ker je v krožnem preskusu preskusne metode (11) pogosteje izpolnjevala merila za veljavnost glede preživetja kot *F. fimetaria*. Če se uporabi alternativna vrsta, mora izpolnjevati merila za veljavnost iz odstavka 9. Na začetku preskusa morajo biti živali dobro nahranjene in stare 23–26 dni (*F. fimetaria*) oz. 9– 12 dni (*F. candida*). Pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti 10 samcev in 10 samic za *F. fimetaria* ter 10 samic za *F. candida* (glej Dodatek 2 in Dodatek 3). Sinhrone živali se izberejo naključno iz posod, za vsako serijo, ki se doda ponovitvi, pa se preverita njihovo zdravje in fizično stanje. Vsaka skupina 10/20 osebkov se doda v naključno izbrano preskusno posodo, pri čemer se velike samice *F. fimetaria* izberejo, da se zagotovi razlikovanje od samcev *F. fimetaria*.

Priprava preskusnih koncentracij

18. Uporabijo se lahko štiri metode dodajanja preskusne kemikalije: 1) mešanje preskusne kemikalije v tla z vodo kot nosilcem, 2) mešanje preskusne kemikalije v tla z organskim topilom kot nosilcem, 3) mešanje preskusne kemikalije v tla s peskom kot nosilcem ali 4) dodajanje preskusne kemikalije na površino tal. Izbira ustrezne metode je odvisna od značilnosti kemikalije in namena preskusa. Na splošno se priporoča umešanje preskusne kemikalije v tla. Vendar bodo morda potrebni postopki dodajanja, ki so skladni s praktično uporabo preskusne kemikalije (npr. pršenje tekočega pripravka ali uporaba posebnih pesticidnih pripravkov, kot so zrnca ali obloge semen). Tla se tretirajo, preden se vanje vnesejo skakači, razen kadar se preskusna kemikalija doda na površino tal, pri čemer je treba skakačem omogočiti, da vstopijo v tla.

Preskusne kemikalija, ki je topna v vodi

19. Raztopina preskusne kemikalije se pripravi v deionizirani vodi v dovolj veliki količini za vse ponovitve ene preskusne koncentracije. Vsaka raztopina preskusne kemikalije se temeljito premeša z eno serijo predhodno namočenih tal, preden se doda v preskusno posodo.

Preskusna kemikalija, ki ni topna v vodi

20. Preskusna kemikalija, ki ni topna v vodi, vendar je topna v organskih topilih, se lahko raztopi v čim manjši prostornini ustreznega topila (npr. acetona), ki še zagotavlja ustrezno mešanje kemikalije v tleh, in zmeša z

▼M6

delom potrebnega kremenovega peska. Uporabijo se lahko le hlapna topila. Če se uporabi organsko topilo, morajo vse preskusne koncentracije in dodatna negativna kontrola s topilom vsebovati enako čim manjšo količino topila. Posode za dodajanje je treba pustiti odkrite dovolj dolgo, da topilo za dodajanje preskusne kemikalije izhlapi, s čimer se prepreči razgradnja preskusne kemikalije v tem času.

Preskusna kemikalija, ki je v vodi in organskih topilih slabo topna

21. Pri kemikalijah, ki so v vodi in organskih topilih slabo topne, se kremenov pesek, ki mora biti del vsega peska, dodanega tlom, zmeša s količino preskusne kemikalije, ki zagotovi potrebno preskusno koncentracijo. Ta mešanica kremenovega peska in preskusne kemikalije se doda predhodno navlaženim tlom in temeljito zmeša po dodajanju ustrezne količine deionizirane vode, da se zagotovi potreben odstotek vlage. Končna mešanica se razdeli v preskusne posode. Postopek se ponovi za vsako preskusno koncentracijo, pri čemer se pripravi tudi ustrezna kontrola.

Dodajanje preskusne kemikalije na površino tal

22. Če je preskusna kemikalija pesticid, je lahko ustrezno dodajanje na površino tal s pršenjem. Tla se tretirajo, ko se vanje dodajo skakači. Preskusne posode se najprej napolnijo z navlaženim substratom tal, dodajo se živali in nato se preskusne posode stehtajo. Da se prepreči neposredna izpostavljenost živali preskusni kemikaliji z neposrednim stikom, se preskusna kemikalija doda vsaj pol ure po vnosu skakačev. Preskusno kemikalijo je treba dodati na površino tal čim bolj enakomerno s primerno laboratorijsko napravo za pršenje, da se simulira pršenje na terenu. Dodajanje mora potekati pri temperaturi v razponu ± 2 °C, za vodne raztopine, emulzije ali disperzije pa pri stopnji nanosa v skladu s priporočili iz ocene tveganja. Stopnjo je treba preveriti z ustrezno kalibracijo. Posebne formulacije, kot so zrnca ali obloge semen, se lahko dodajajo, kot je skladno z uporabo v kmetijstvu. Hrana se doda po pršenju.

POSTOPEK

Preskusni pogoji

23. Srednja temperatura preskusa mora biti 20 °C ± 1 °C s temperaturnim razponom 20 °C ± 2 °C. Preskus se izvede pri nadzorovanih ciklih svetlobe in teme (po možnosti 12 ur svetlobe in 12 ur teme) z osvetljenostjo od 400 do 800 luksov na območju preskusnih posod.

24. Da se preveri vlažnost tal, se posode tehtajo na začetku preskusa, sredi preskusa in na koncu preskusa. Izguba vode > 2 % se nadomesti z dodajanjem deionizirane vode. Opozoriti je treba, da se lahko izguba vode zmanjša z vzdrževanjem visoke vlažnosti zraka (> 80 %) v preskusnem inkubatorju.

25. pH je treba izmeriti na začetku in koncu preskusa za določanje območja delovanja in končnega preskusa. Meritve je treba izvesti v enem dodatnem kontrolnem vzorcu in enem dodatnem vzorcu vzorcev tretiranih tal (vse koncentracije), ki se pripravi in vzdržuje enako kot preskusne kulture, vendar brez dodajanja skakačev.

Preskusni postopek in meritve

26. Za vsako koncentracijo se v preskusno posodo doda količina preskusnih tal, ki ustreza 30 g sveže teže. Pripravijo se tudi kontrole z vodo brez preskusne

▼M6

kemikalije. Če se za dodajanje preskusne kemikalije uporablja vehikel, je treba poleg preskusnih serij izvesti tudi kontrolne serije, ki vsebujejo samo vehikel. Koncentracija topila ali disperzijskega sredstva mora biti enaka kot koncentracija v preskusnih posodah s preskusno kemikalijo.

27. Posamezni skakači se previdno prenesejo v posamezno preskusno posodo (naključno porazdeljeni v preskusne posode) in položijo na površino tal. Za učinkovit prenos živali se lahko uporabi nizkotlačni sesalnik. Število ponovitev za preskusne koncentracije in kontrole je odvisno od uporabljenega načrta preskusa. Preskusne posode se naključno razporedijo po preskusnem inkubatorju in nato vsak teden naključno prerazporedijo.

28. Za preskus s *F. fimetaria* je treba uporabiti 20 odraslih osebkov, od tega 10 samcev in 10 samic, starih 23–26 dni. Na 21. dan se skakači ekstrahirajo iz tal in preštejejo. Pri *F. fimetaria* se spol loči po velikosti v seriji sinhronih živali, uporabljeni za preskus. Samice so značilno večje od samcev (glej Dodatek 3).

29. Za preskus s *F. candida* je treba uporabiti deset 9– 12 dni starih mladičev na preskusno posodo. Na 28. dan se skakači ekstrahirajo iz tal in preštejejo.

30. Kot primeren vir hrane se na začetku preskusa in po približno dveh tednih v vsako posodo doda ustrezna količina, npr. 2– 10 mg, zrnastega suhega pekovskega kvasa, ki je komercialno dostopen za uporabo v gospodinjstvu.

31. Na koncu preskusa se ocenita smrtnost in razmnoževanje. Po treh (*F. fimetaria*) ali štirih tednih (*F. candida*) se skakači ekstrahirajo iz preskusnih tal (glej Dodatek 4) in preštejejo (12). Skakač se šteje za mrtvega, če pri štetju ni prisoten. Metodi ekstrakcije in štetja morata biti validirani. Validacija vključuje učinkovitost ekstrakcije mladičev, ki je večja od 95 %, npr. z dodajanjem znanega števila v tla.

32. Praktični povzetek in časovni razpored preskusnega postopka sta opisana v Dodatku 2.

Načrt preskusa

Preskus za določanje območja delovanja

33. Po potrebi se preskus za določanje območja delovanja izvede na primer s petimi koncentracijami preskusne kemikalije, in sicer 0,1, 1,0, 10, 100 in 1 000 mg/kg suhe teže tal ter dvema ponovitvama za vsako tretiranje in kontrolo. Pri določanju območja koncentracij, ki jih je treba uporabiti pri preskusu za določanje območja delovanja, so lahko uporabne tudi dodatne informacije o smrtnosti in razmnoževanju skakačev, ki izhajajo iz preskusov s podobnimi kemikalijami ali iz literature.

34. Preskus za določanje območja delovanja traja dva tedna pri *F. fimetaria* in tri tedne pri *F. candida*, da se dobi eno leglo mladičev. Na koncu preskusa se ocenita smrtnost in razmnoževanje skakačev. Zabeležiti je treba število odraslih in pojav mladičev.

Končni preskus

35. Za določitev EC_x (npr. EC_{10}, EC_{50}) je treba uporabiti dvanajst koncentracij. Priporočata se vsaj dve ponovitvi za vsako tretiranje s preskusno koncentracijo in šest kontrolnih ponovitev. Faktor oddaljenosti se lahko razlikuje glede na vzorec odziva na odmerek.

▼M6

36. Za določitev NOEC/LOEC je treba preskusiti vsaj pet koncentracij v geometrijskem zaporedju. Priporočajo se vsaj štiri ponovitve za vsako tretiranje s preskusno koncentracijo in osem kontrol. Razmik med koncentracijami je treba določiti s faktorjem, ki ne presega 1,8.

37. Združen pristop omogoča določitev NOEC/LOEN in ECx. Pri tem združenem pristopu je treba uporabiti osem koncentracij za tretiranje v geometrijskem zaporedju. Priporočajo se vsaj štiri ponovitve za vsako tretiranje in osem kontrol. Razmik med koncentracijami je treba določiti s faktorjem, ki ne presega 1,8.

38. Če se pri preskusu za določanje območja delovanja ne opazijo učinki pri najvišji koncentraciji (tj. 1 000 mg/kg), se lahko kot mejni preskus izvede preskus razmnoževanja, pri čemer se uporabita preskusna koncentracija 1 000 mg/kg in kontrola. Z mejnim preskusom se zagotovi priložnost za dokaz, da pri mejni koncentraciji ni statistično značilnega učinka. Osem ponovitev je treba uporabiti tako za tretirana tla kot kontrolo.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

39. Sposobnost razmnoževanja je glavna končna točka (npr. število ustvarjenih mladičev na preskusno posodo). S statistično analizo, npr. postopki analize variance, se primerjajo tretiranja s t-preskusom, Dunnettovim preskusom ali Williamsovim preskusom. Za sredine posameznih tretiranj se izračunajo 95-odstotni intervali zaupanja.

40. Število preživelih odraslih v netretiranih kontrolah je pomembno merilo za veljavnost in ga je treba dokumentirati. Tako kot pri preskusu za določanje območja delovanja je treba v končnem poročilu navesti tudi vse druge škodljive znake.

LC_x in EC_x

41. Vrednosti EC_x, vključno s spodnjimi in zgornjimi 95-odstotnimi mejami zaupanja za parameter, povezanimi z njimi, se izračunajo po ustreznih statističnih metodah (npr. logistična ali Weibullova funkcija, spremenjena metoda Spearman-Karber ali linearna interpolacija). ECx se pridobi tako, da se v postavljeno enačbo vstavi vrednost, ki ustreza x % sredine kontrole. Za izračun EC_{50} ali katere koli druge vrednosti EC_x je treba za celoten niz podatkov opraviti regresijsko analizo. LC_{50} se običajno oceni z analizo probit ali podobno analizo, ki upošteva binomsko porazdeljene podatke o smrtnosti.

NOEC/LOEC

42. Če se bo NOEC/LOEC določala s statistično analizo, so potrebni statistični podatki (posamezne posode se štejejo za ponovitve) po posodah. Uporabiti je treba ustrezne statistične metode v skladu z dokumentom OECD št. 54 o sedanjih pristopih k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernica za uporabo (9). Na splošno se škodljivi učinki preskusne kemikalije v primerjavi s kontrolo proučujejo s preskušanjem enostransko zastavljene hipoteze pri $p \leq 0,05$.

43. Normalna porazdelitev in homogenost varianc se lahko preskusita z ustreznim statističnim preskusom, npr. Shapiro-Wilkovim preskusom oz. Levenejevim preskusom ($p \leq 0,05$). Izvedejo se lahko enofaktorska analiza

▼M6

variance (ANOVA) in nadaljnje metode večkratne primerjave. Metode večkratne primerjave (npr. Dunnettov preskus) ali regresivni preskusi trenda (npr. Williamsov preskus) se lahko uporabijo za izračun, ali obstajajo znatne razlike ($p \leq 0,05$) med kontrolami in različnimi koncentracijami preskusne kemikalije (izbira priporočenega preskusa v skladu s dokumentom OECD št. 54 (9)). V nasprotnem primeru se lahko za določitev NOEC in LOEC uporabijo neparametrične metode (npr. Bonferronijev U-preskus v skladu s preskusom trenda po Holmu ali Jonckheere-Terpstraju).

Mejni preskus

44. Če je bil mejni preskus (primerjava kontrol in izključeno enega tretiranja) izveden in so izpolnjeni predpogoji za postopke parametričnega preskusa (normalnost, homogenost), se lahko odzivi metrik ocenijo s t-preskusom. Če te zahteve niso izpolnjene, se lahko uporabi t-preskus za neenake variance (Welchev t-preskus) ali neparametrični preskus, kot je Mann-Whitneyjev U-preskus.

45. Za določanje znatnih razlik med kontrolami (kontrola in kontrola s topilom) se lahko ponovitve posameznih kontrol preskusijo, kot je opisano za mejni preskus. Če se znatne razlike s temi preskusi ne zaznajo, se lahko vse kontrolne ponovitve in kontrolne ponovitve s topilom združijo. V nasprotnem primeru je treba vsa tretiranja primerjati s kontrolo s topilom.

Poročilo o preskusu

46. V poročilu o preskusu morajo biti vsaj naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— identiteta preskusne kemikalije, serija, skupina in številka CAS, čistoča,

— fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije (npr. Kow, topnost v vodi, parni tlak, Henryjeva konstanta (H) in po možnosti informacije o končnem stanju preskusne kemikalije v tleh), če so na voljo,

— formulacija preskusne kemikalije in navedba dodatkov, če se ne preskuša čista kemikalija.

Preskusni organizmi

— identifikacija vrste in dobavitelja preskusnih organizmov, opis pogojev razmnoževanja in starostni razpon preskusnih organizmov.

Preskusni pogoji

— opis načrta poskusa in postopkov,

— podrobnosti o pripravi preskusnih tal, natančna specifikacija, če se uporabijo naravna tla (izvor, zgodovina, porazdelitev delcev glede na velikost, pH, vsebnost organske snovi),

— zmogljivost tal za zadrževanje vode,

— opis tehnike, uporabljene za dodajanje preskusne kemikalije v tla,

— preskusni pogoji: jakost svetlobe, trajanje ciklov svetlobe in teme, temperatura,

— opis načina hranjenja, vrsta in količina hrane, uporabljene v preskusu, datumi hranjenja,

— pH in vsebnost vode v tleh na začetku in koncu preskusa (kontrola in posamezno tretiranje),

— natančen opis metode ekstrakcije in učinkovitosti ekstrakcije.

▼**M6**

Rezultati preskusa

— število mladičev, določeno v posamezni preskusni posodi na koncu preskusa,

— število odraslih in njihova smrtnost (%) v posamezni preskusni posodi na koncu preskusa,

— opis očitnih fizioloških ali patoloških simptomov ali izrazitih sprememb v obnašanju,

— rezultati, pridobljeni z referenčno preskusno kemikalijo,

— vrednosti NOEC/LOEC, LC_x za smrtnost in EC_x za razmnoževanje (zlasti LC_{50}, LC_{10}, EC_{50}, in EC_{10}) skupaj s 95-odstotnimi intervali zaupanja. Graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, enačba njegove funkcije in njegovi parametri (glej (9)),

— vse informacije in opažanja, koristni za razlago rezultatov,

— vrednost dejanskega preskusa, če se izvede preskušanje domnev (9),

— odstopanja od postopkov, opisanih v tej preskusni metodi, in vsi nenavadni pojavi med preskusom,

— veljavnost preskusa,

— če se oceni NOEC, najmanjša zaznavna razlika.

LITERATURA

(1) Wiles, J. A., in Krogh, P. H. (1998). Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. V: Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ur. H Løkke in CAM Van Gestel), str. 131– 156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

(2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. Mednarodna organizacija za standardizacijo, Ženeva.

(3) Burges, A., in Raw, F. (ur.) (1967). Soil Biology. Academic Press. London.

(4) Petersen, H., in Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

(5) Petersen, H. (1994). A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111– 118.

(6) Hopkin, S. P. (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 str. (ISBN 0-19-854084-1).

(7) Ulber, B. (1983). Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. V: New trends in soil Biology (Lebrun, Ph., André, H. M., De Medts, A., Grégoire-Wibo, Wauthy, G. (ur.), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgija), od 30. avgusta do 2. septembra 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, str. 261–268.

(8) Poglavje C.36 te priloge, *Preskus razmnoževanja plenilske pršice (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) v tleh.*

(9) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Pariz.

(10) Scott-Fordsmand, J. J., in Krogh, P. H. (2005). Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 str. Dansko ministrstvo za okolje.

▼**M6**

(11) Krogh, P. H. (2009). Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danska agencija za varstvo okolja, okoljski projekt št. 1256, str. 66.

(12) Krogh, P. H., Johansen, K., in Holmstrup, M. (1998). Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201–205.

(13) Fjellberg, A. (1980). Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards, C. A. (1955). Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. V: Soil Zoology (Kevan D. K. McE., ur.). Butterworths, London, str. 412–416.

(15) Goto, H. E. (1960). Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96: 138– 140.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve (v tem preskusu so vse učinkovite koncentracije izražene kor masa preskusne kemikalije na suho maso preskusnih tal):

Kemikalija je snov ali zmes.

NOEC (koncentracija brez opaznega učinka) je koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se učinki ne opazijo. V tem preskusu koncentracija, ki ustreza NOEC, v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$) v določenem obdobju izpostavljenosti.

LOEC (najnižja koncentracija z opaznim učinkom) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki ima v primerjavi s kontrolo statistično značilen učinek ($p < 0,05$) v določenem obdobju izpostavljenosti.

ECx (koncentracija z učinkom za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v določenem obdobju izpostavljenosti. EC_{50} je na primer koncentracija, za katero se oceni, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

▼M6

Dodatek 2

Glavni ukrepi in časovni razpored za izvedbo preskusa pri skakačih

Koraki preskusa so naslednji:

Čas (dan)	Ukrep
– 23 do – 26	priprava sinhrone kulture*F. Fimetaria*;
– 14	priprava umetnih tal (mešanje suhih sestavin); preverjanje pH umetnih tal in ustrezna prilagoditev; meritev največje zmogljivosti tal za zadrževanje vode;
– 9 do – 12	priprava sinhrone kulture*F. Candida*;
– 2 do – 7	predhodna navlažitev tal;
– 1	razporeditev mladičev v skupine; priprava založnih raztopin in dodajanje preskusne kemikalije, če je potrebno topilo;
0	priprava založne raztopine in dodajanje preskusne kemikalije, če je potrebna uporaba trdne kemikalije, vodotopne kemikalije ali dodajanja na površino; meritev pH tal in tehtanje posod; dodajanje hrane. Vnos skakačev;
14	preskus za določanje območja delovanja za *F. fimetaria*: prekinitev preskusa, ekstrakcija živali, meritev pH tal in izgube vode (teža); končni preskusi: meritev odstotka vlage, nadomestitev vode in dodajanje 2–10 mg kvasa;
21	končni preskus za *F. fimetaria*: prekinitev preskusa, ekstrakcija živali, merjenje pH tal in izgube vode (teža); preskus za določanje območja delovanja za *F. candida*: prekinitev preskusa, ekstrakcija živali, meritev pH tal in izgube vode (teža);
28	končni preskus za *F. candida*: prekinitev preskusa, ekstrakcija živali, meritev pH tal in izgube vode (teža).

▼M6

Dodatek 3

Smernica za gojenje in sinhronizacijo *F. fimetaria* in *F. candida*

Čas in trajanja iz te smernice je treba preveriti pri vsakem posameznem sevu skakačev za zagotovitev, da bo časovni razpored omogočal ustrezno sinhronizirane mladiče. Pojav odlaganja jajčec po prenosu odraslih osebkov v svež substrat in izvalitev iz jajčec določata ustrezen dan za zbiranje jajčec in sinhronih mladičev.

Priporoča se, da stalna založna kultura zajema npr. 50 posod/petrijevk. Prehranjevalne pogoje založne kulture je treba dobro vzdrževati s tedenskim hranjenjem, dodajanjem vode ter odstranjevanjem stare hrane in trupel. Premalo skakačev na substratu lahko privede do zaviranja zaradi večje rasti plesni. Če se založna kultura prepogosto uporablja za proizvajanje jajčec, se lahko kultura utrudi. Znaki utrujenosti so mrtvi odrasli in plesen na substratu. Jajčeca, ki ostanejo pri pridobivanju sinhronih živali, se lahko uporabijo za pomlajevanje kulture.

V sinhroni kulturi *F. fimetaria* se samci ločijo od samic zlasti po velikosti. Samci so očitno manjši od samic in hodijo hitreje od samic. Za pravilno izbiro spola je potrebne nekaj prakse in se lahko potrdi z mikroskopskim pregledom genitalnega dela (13).

1. **Gojenje**

1.a *Priprava gojiščnega substrata*

Gojiščni substrat je mavec (kalcijev sulfat) z aktivnim ogljem. To zagotavlja vlažen substrat, pri čemer je funkcija oglja absorpcija odpadnih plinov in iztrebkov (14) (15). Za lažje opazovanje skakačev se lahko uporabijo različne oblike oglja. Za *F. candida* in *F. fimetaria* se na primer uporablja oglje v prahu (zagotavlja črn/siv mavec):

Sestavine substrata:

— 20 ml aktivnega oglja,

— 200 ml destilirane vode,

— 200 ml mavca

ali

— 50 g aktivnega oglja v prahu,

— 260–300 ml destilirane vode,

— 400 g mavca.

Zmes substrata se pred uporabo strdi.

1.b *Razmnoževanje*

Skakači so v posodah, kot so petrijevke (90 mm × 13 mm), katerih dno je prekrito z 0,5 cm debelo plastjo substrata iz mavca/oglja. Gojijo se pri 20 °C ± 1 °C ter ciklu 12 ur svetlobe in 12 ur teme (400–800 luksov). Posode so vedno vlažne, kar zagotavlja, da je relativna vlažnost zraka v njih 100-odstotna. To se lahko zagotovi s prisotnostjo proste vode v poroznem mavcu, vendar je treba preprečiti nastanek vodnega filma na površini mavca.

▼M6

Izguba vode se lahko prepreči z zagotavljanjem vlažnega zraka prostora. Vse mrtve živali in plesnivo hrano je treba odstraniti iz posod. Za spodbujanje proizvajanja jajčec je treba odrasle živali prenesti v petrijevke z novo pripravljenim substratom iz mavca/oglja.

1.c *Vir hrane*

Kot edini vir hrane za *F. candida* in *F fimetaria* se uporablja zrnasti suhi pekovski kvas. Sveža hrana se dodaja enkrat ali dvakrat na teden, da se prepreči nastajanje plesni. V majhnem kupu se položi neposredno na mavec. Količino dodanega pekovskega kvasa je treba prilagoditi velikosti populacije skakačev, vendar na splošno ustreza 2–15 mg.

2. **Sinhronizacija**

Preskus je treba izvesti s sinhroniziranimi živalmi, da se zagotovijo homogene preskusne živali enakega stadija in velikosti. Sinhronizacija omogoča tudi ločevanje samcev in samic *F. fimetaria*, ko so stari tri tedne, na podlagi spolnega dimorfizma, tj. razlik v velikosti. Spodnji postopek je predlog za pridobivanje sinhroniziranih živali (praktični koraki niso obvezni).

2.a *Sinhronizacija*

— Pripravijo se posode z 0,5 cm debelo plastjo substrata iz mavca/oglja.

— Za odlaganje jajčec se 150–200 odraslih osebkov *F. fimetaria* in 50–100 *F. candida* iz najboljših 15–20 posod z založno kulturo s 4–8 tednov starim substratom prenese v posode, kjer se jih hrani s 15 mg pekovskega kvasa. Izogniti se je treba prenosu mladičev skupaj z odraslimi, saj lahko prisotnost mladičev zavira proizvajanje jajčec.

— Kultura se vzdržuje pri 20 °C ± 1 °C (sredina mora biti 20 °C) ter ciklu 12 ur svetlobe in 12 ur teme (400–800 luksov). Zagotovita se razpoložljivost sveže hrane in nasičenost zraka z vodo. Zaradi pomanjkanja hrane se lahko živali iztrebljajo na jajčeca, kar povzroča rast plesni na njih, *F. candida* pa lahko poje lastna jajčeca. Po 10 dneh se jajčeca skrbno zberejo z iglo in lopatico ter prenesejo na „papir za jajčeca“ (majhni kosi filtrirnega papirja, pomočeni v kašo iz mavca/oglja), ki se položi v posodo s svežim substratom iz mavca/oglja Substratu se doda nekaj zrn kvasa, ki spodbujajo mladiče, da zapustijo papir za jajčeca. Pomembno je, da sta papir za jajčeca in substrat vlažna, sicer lahko jajčeca dehidrirajo. Namesto tega se lahko odrasle živali odstranijo iz gojiščnih posod za sinhronizacijo, ko 2 ali 3 dni proizvajajo jajčeca.

— Po treh dneh se bo večina jajčec na papirju za jajčeca izlegla, pri čemer se lahko nekateri mladiči nahajajo pod papirjem za jajčeca.

— Za zagotovitev enako starih mladičev se papir za jajčeca, na katerem so neizvaljena jajčeca, odstrani iz petrijevke s prijemalkami. Mladiči, zdaj stari 0–3 dni, ostanejo v posodi in se hranijo s pekovskim kvasom. Neizvaljena jajčeca se zavržejo.

— Jajčeca in izvaljeni mladiči se gojijo enako kot odrasli. Zlasti za *F. fimetaria* je treba sprejeti naslednje ukrepe: zagotovitev ustrezne sveže hrane, odstranjevanje stare in plesnive hrane in razdelitev mladičev v nove petrijevke po enem tednu, če je gostota večja od 200.

▼**M6**

2.b *Ravnanje s skakači ob začetku preskusa*

— Devet do dvanajsti dni stari osebki *F. candida* ali 23–26 dni stari osebki *F. fimetaria* se zberejo, npr. s sesanjem, in spustijo v majhno posodo z vlažnim substratom iz mavca/oglja, pod binokularnim mikroskopom pa se pregleda njihovo fizično stanje (poškodovane živali se zavržejo). Vse korake je treba izvesti medtem, ko so skakači v vlažni atmosferi, da se prepreči stres zaradi pomanjkanja vode, npr. z uporabo namočenih površin itd.

— Posoda se obrne navzdol, pri čemer se potrka nanjo, da se skakači prenesejo v tla. Statično elektriko je treba nevtralizirati, sicer lahko živali poletijo v zrak ali se prilepijo na stran preskusne posode in izsušijo. Za nevtralizacijo se lahko uporabi ionizator ali vlažna krpa pod posodo.

— Hrano je treba razporediti po vsej površini tal in ne le v enem kupu.

— Med prenosom in preskušanjem se ne sme udarjati po preskusnih posodah ali jih drugače fizično motiti, saj bi to lahko povečalo stiskanje tal in oviralo interakcijo med skakači.

3. **Alternativne vrste skakačev**

Za preskušanje po tej preskusni metodi se lahko izberejo druge vrste skakačev, kot so *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi* in *Mesaphorura macrochaeta*. Pred uporabo alternativnih vrst morajo biti izpolnjeni številni predpogoji:

— biti morajo nedvoumno identificirane,

— izbiro vrste je treba utemeljiti,

— zagotoviti je treba, da je v fazo preskušanja vključena reproduktivna biologija, da bo to med izpostavljenostjo potencialen cilj,

— znana mora biti zgodovina življenja: starost pri zrelosti, trajanje razvoja jajčec in stadiji, v katerih poteka izpostavljenost,

— s preskusnim substratom in virom hrane je treba zagotoviti optimalne pogoje za rast in razmnoževanje,

— variabilnost mora biti ustrezno nizka za natančno in točno oceno strupenosti.

▼M6

Dodatek 4

Ekstrakcija in štetje živali

1. **Ekstrakcija se lahko izvede na dva načina.**

1.a Prvi način: uporabi se lahko ekstraktor z nadzorovanim padanjem temperature, ki temelji na MacFadyenovih načelih (1). Toplota prihaja iz grelnega elementa na vrhu ekstrakcijske posode (uravnava se s termistorjem na površini vzorca tal). Temperatura v ohlajeni tekočini, ki obdaja zbiralno posodo, se uravnava s termistorjem na površini zbiralne posode (pod jedrom tal). Termistorja sta povezana s krmilno enoto, ki se lahko programira in poveča temperaturo glede na predhodno nastavljen urnik. Živali se zberejo v ohlajeni zbiralni posodi (2 °C) s spodnjo plastjo mavca/oglja. Ekstrakcija se začne pri 25 °C, pri čemer se temperatura vsakih 12 ur samodejno poveča za 5 °C, skupaj pa traja 48 ur. Ekstrakcija je končana po 12 urah pri 40 °C.

1.b Drugi način: po inkubacijski dobi po poskusu se število mladičev skakačev oceni s flotacijo. Za ta namen se preskus izvede v posodah s prostornino približno 250 ml. Na koncu preskusa se doda približno 200 ml vode. Tla se nežno premešajo s finim čopičem, kar skakačem omogoči lebdenje na vodni gladini. Vodi se lahko doda majhna količina, približno 0,5 ml, črne fotografske barve Kentmere, s čimer se zaradi večjega kontrasta med vodo in belimi skakači olajša štetje. Barva za skakače ni strupena.

2. **Štetje:**

Šteje se lahko s prostim očesom ali pod svetlobnim mikroskopom z mrežo nad posodo za flotacijo ali s fotografiranjem površine posamezne posode in poznejšim štetjem skakačev na povečanih slikah ali projiciranih diapozitivih. Štetje se lahko izvede tudi s tehnikami digitalne obdelave slik (12). Vse tehnike morajo biti validirane.

▼M6

Dodatek 5

Določitev največje zmogljivosti tal za zadrževanje vode

Ugotovljeno je bilo, da je naslednja metoda za določanje največje zmogljivosti tal za zadrževanje vode (WHC) ustrezna. Opisana je v Prilogi C k ISO DIS 11268-2 (Kakovost tal – Vpliv onesnaževal na deževnike (*Eisenia fetida*). Del 2: Določitev vpliva na razmnoževanje).

Z ustrezno napravo na vzorčenje (npr. svedrasti vzorčevalnik) se zbere določena količina (npr. 5. g) substrata preskusnih tal. Dno vzorčevalnika se pokrije s kosom mokrega filtrirnega papirja, nato pa se postavi na podstavek v vodni kopeli. Vzorčevalnik je treba postopno potopiti, dokler ni nivo vode nad vrhom tal. Nato ga je treba pustiti v vodi približno tri ure. Ker ni mogoče ohraniti vse vode, ki so jo absorbirale kapilare v tleh, se mora vzorec tal odtekati dve uri, tako da se vzorčevalnik položi na podlago iz zelo mokrega fino drobljenega kremenovega peska v pokriti posodi (da se prepreči izsušitev). Nato je treba vzorec stehtati in sušiti do konstantne mase pri 105 °C. Zmogljivost zadrževanja vode (WHC) je treba izračunati, kot sledi:

$$\text{WHC (v \% suhe mase)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

pri čemer je:

S = substrat, prepojen z vodo + masa cevi + masa filtrirnega papirja,

T = tara (masa cevi + masa filtrirnega papirja),

D = suha masa substrata.

▼**M6**

Dodatek 6

Določanje pH tal

Naslednja metoda za določanje pH tal temelji na opisu iz ISO DIS 10390: Kakovost tal – Določanje pH.

Določena količina tal se suši pri sobni temperaturi vsaj 12 ur. Suspenzija tal (ki vsebuje vsaj 5 g tal) se nato naredi v petkratni prostornini tal z 1 M raztopine analitsko čistega kalijevega klorida (KCl) ali 0,01 M raztopine analitsko čistega kalcijevega klorida ($CaCl_2$). Suspenzija se temeljito pretresa pet minut in nato počiva vsaj dve uri, vendar ne dlje kot 24 ur. Nato se pH tekoče faze izmeri z merilnikom vrednosti pH, ki je pred vsakim merjenjem kalibriran z ustrezno serijo puferskih raztopin (npr. pH 4,0 in 7,0).

▼M6

C.40 PRESKUS STRUPENOSTI ŽIVLJENJSKEGA CIKLA S TRZAČAMI V SISTEMU VODE IN USEDLINE Z UPORABO VODE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO ALI USEDLINE S PRIMEŠANO PRESKUSNO SNOVJO

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 233 (2010). Zasnovana je za ocenjevanje učinkov vseživljenjske izpostavljenosti sladkovodnega dvokrilca *Chironomus sp.* kemikalijam ter v celoti zajema prvo generacijo (generacija P) in zgodnji del druge generacije (generacija F1). Je razširitev obstoječih preskusnih metod C.28 (1) in C.27 (15) z uporabo scenarija izpostavljenosti vodi s primešano preskusno snovjo oziroma usedlini s primešano preskusno snovjo. Upošteva obstoječe protokole za preskušanje strupenosti za *Chironomus riparius* in *Chironomus dilutus* (ki sta se prej imenovala *C. tentans* (2)), ki so bili pripravljeni v Evropi in Severni Ameriki (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) ter nato krožno preskušeni (1) (7) (10) (11) (12). Uporabijo se lahko tudi druge dobro dokumentirane vrste trzače, npr. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Celotna izpostavljenost traja približno 44 dni za *C. riparius* in *C. yoshimatsui* ter približno 100 dni za *C. dilutus*.

2. V tej preskusni metodi je opisan tako scenarij izpostavljenosti vodi kot scenarij izpostavljenosti usedlini. Izbira ustreznega scenarija izpostavljenosti je odvisna od namena uporabe preskusa. Scenarij izpostavljenosti, ki vključuje primešanje preskusne snovi v vodni stolpec, je namenjen simulaciji pojava zanašanja pesticidov in zajema začetno najvišjo koncentracijo v površinskih vodah. Primešanje preskusne snovi v vodo je uporabno tudi za druge vrste izpostavljenosti (vključno z razlitji kemikalij), vendar ne za procese kopičenja v usedlini, ki trajajo dlje od preskusnega obdobja. V tem primeru in če je odtekanje glavni način vnosa pesticidov v vodna telesa, je lahko primernejši načrt z usedlino s primešano preskusno snovjo. Če so drugi scenariji izpostavljenosti aktualni, se lahko načrt preskusa enostavno prilagodi. Če razporeditev preskusne kemikalije med vodno fazo in usedlino na primer ni aktualna in je treba čim bolj zmanjšati adsorpcijo v usedlino, se lahko predvidi uporaba nadomestne umetne usedline (npr. kremenovega peska).

3. Kemikalije, za katere je treba preskusiti organizme, živeče v usedlini, se lahko v usedlini ohranijo zelo dolgo. Organizmi, živeči v usedlinah, so lahko izpostavljeni na številne načine. Relativni pomen vsakega načina izpostavljenosti in čas, da ta prispeva k skupnim strupenim učinkom, sta odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti kemikalije. Pri kemikalijah, ki se močno adsorbirajo, ali kemikalijah, ki se kovalentno vežejo na usedlino, je lahko zaužitje onesnažene hrane pomemben način izpostavljenosti. Da ne bi podcenili strupenosti visoko lipofilnih kemikalij, se lahko predvidi uporaba hrane, dodane usedlini pred uporabo preskusne kemikalije (glej odstavek 31). Zato se lahko vključijo vsi načini izpostavljenosti in vsi življenjske faze.

4. Izmerjene končne točke so skupno število odraslih preobraženih osebkov (za prvo in drugo generacijo), hitrost razvoja (za prvo in drugo generacijo), razmerje med spoloma pri živih odraslih, v celoti preobraženih osebkih (za prvo in drugo generacijo), število nizov jajčec na samice (samo prva generacija) in fertilnost nizov jajčec (samo prva generacija).

5. Zelo se zelo priporoča formulirana usedlina. Ta ima pred naravnimi usedlinami več prednosti:

▼M6

— variabilnost pri poskusih je manjša, saj formulirana usedlina pomeni obnovljivi „standardizirani matriks“, poleg tega ni več treba iskati virov neonesnaženih in čistih usedlin,

— preskusi se lahko začnejo kadar koli, ne da bi se bilo treba ukvarjati s sezonsko variabilnostjo v preskusni usedlini, poleg tega usedline ni treba predhodno tretirati, da bi se odstranila domorodna favna,

— nižji stroški v primerjavi z odvzemom zadostne količine usedline na terenu, potrebne za rutinsko preskušanje,

— formulirana usedlina omogoča primerjave strupenosti in ustrezno razvrstitev kemikalije (3).

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

7. Ličinke trzače prvega stadija so izpostavljene razponu koncentracije preskusne kemikalije v sistemu vode in usedline. Preskus se začne z vnosom ličink prvega stadija (prva generacija) v preskusne čaše, ki vsebujejo usedlino s primešano preskusno snovjo, ali pa se preskusna kemikalija primeša v vodo po vnosu ličink. Ocenijo se preobrazba trzače, čas do preobrazbe in razmerje med spoloma pri živih odraslih, v celoti preobraženih trzačah. Preobraženi odrasli se prenesejo v kletke za razmnoževanje, da se olajšajo rojenje, parjenje in odlaganje jajčec. Ocenita se število odloženih nizov jajčec in njihova fertilnost. Iz teh nizov jajčec se pridobijo ličinke prvega stadija druge generacije. Te ličinke se prenesejo v sveže pripravljene preskusne čase (postopek primešanja preskusne snovi kot pri prvi generaciji), da se določi sposobnost preživetja druge generacije z oceno njihove preobrazbe, časa do preobrazbe in razmerja med spoloma pri v celoti preobraženih, živih trzačah (shematska predstavitev preskusa življenjskega cikla je navedena v Dodatku 5). Vsi podatki se analizirajo z regresivnim modelom, da se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno zmanjšanje v zvezi z zadevno končno točko, ali s preskušanjem domnev, da se določi koncentracija brez opaznega učinka (NOEC). Pri slednjem je potrebna primerjava odzivov na tretiranje z ustreznimi odzivi na kontrolo s statističnimi preskusi. Opozoriti je treba, da so lahko pri scenariju z vodo s primešano preskusno snovjo v primeru kemikalij, ki se hitro razgradijo, ličinke v poznejši življenjski fazi posamezne generacije (npr. faza bube) izpostavljene znatno manjši ravni koncentracije v vodi nad usedlino kot ličinke prvega stadija. Če je to zadržek in je potrebna primerljiva stopnja izpostavljenosti za posamezno življenjsko fazo, se lahko predvidita naslednji spremembi preskusne metode:

— vzporedni preskusi s primešanjem preskusne snovi v različnih življenjskih fazah ali

— ponavljajoče se primešanje preskusne snovi (ali obnovitev vode nad usedlino) v preskusnem sistemu med obema preskusnima fazama (prva in druga generacija), pri čemer je treba razmike med primešanjem (obnovo) prilagoditi končnim značilnostim preskusne kemikalije.

Takšne spremembe so izvedljive le pri scenariju z vodo s primešano preskusno snovjo, vendar ne pri scenariju z usedlino s primešano preskusno snovjo.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

8. Znani morajo biti topnost preskusne kemikalije v vodi, njen parni tlak in log K_{ow}, izmerjeni ali izračunani porazdelitveni koeficient v usedlini ter stabilnost v vodi in usedlini. Za kvantifikacijo preskusne kemikalije v vodi nad usedlino, porni vodi in usedlini mora biti na voljo zanesljiva analitska metoda z znano in izpričano natančnostjo ter mejo zaznavnosti.

▼M6

Koristni informaciji sta tudi strukturna formula in čistost preskusne kemikalije. Prav tako je koristno poznati obnašanje preskusne snovi v okolju (npr. disipacija, abiotska in biotska razgradnja itd.). Dodatne smernice za preskušanje kemikalij s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, zaradi katerih je preskušanje oteženo, so navedene v (16).

REFERENČNE KEMIKALIJE

9. Referenčne kemikalije se lahko redno preskušajo kot sredstvo za zagotavljanje, da se občutljivost laboratorijske populacije ni spremenila. Tako kot pri vodnih bolhah je dovolj izvedba 48-urnega akutnega preskusa (v skladu s 17). Dokler ni na voljo validirana smernica za akutno preskušanje, se lahko predvidi kronični preskus v skladu s poglavjem C.28 te priloge. Primeri referenčnih strupenih snovi, ki so bile uspešno uporabljene v krožnih preskusih in validacijskih študijah, so: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, kadmijev klorid in kalijev klorid (1) (3) (6) (7) (18).

VELJAVNOST PRESKUSA

10. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— srednja preobrazba v kontrolnem tretiranju mora biti na koncu obdobja izpostavljenosti pri obeh generacijah vsaj 70-odstotna (1) (7),

— pri *C. riparius* in *C. yoshimatsui* se mora 85 % vseh trzač, preobraženih v odrasle osebke, iz kontrolnega tretiranja v obeh generacijah pojaviti med 12. in 23. dnem po vnosu ličink prvega stadija v posode; pri *C. dilutus* je sprejemljivo obdobje od 20 do 65 dni,

— srednje razmerje med spoloma pri živih odraslih, v celoti preobraženih osebkih (kot ženski ali moški del) v kontrolnem tretiranju obeh generacij mora biti vsaj 0,4, vendar ne več kot 0,6,

— v vsaki kletki za razmnoževanje mora biti število nizov jajčec v kontrolah za prvo generacijo vsaj 0,6 na samico, dodano v kletko za razmnoževanje,

— delež fertilnih nizov jajčec v posamezni kletki za razmnoževanje kontrol prve generacije mora biti vsaj 0,6,

— na koncu obdobja izpostavljenosti je treba za obe generaciji v vsaki posodi izmeriti pH in koncentracijo raztopljenega kisika. Koncentracija kisika mora biti vsaj 60 % nasičenosti z zrakom (ASV ([1])), pH vode nad usedlino pa mora biti v vseh posodah med 6 in 9,

— temperatura vode se ne sme razlikovati za več kot ± 1,0 °C.

OPIS METODE

Preskusne posode in kletke za razmnoževanje

11. Ličinke se izpostavijo v 600-mililitrskih steklenih čašah s premerom približno 8,5 cm (glej Dodatek 5). Primerne so tudi druge posode, vendar morajo zagotavljati primerno debelino usedline in vode nad njo. Površina usedline mora biti dovolj velika, da zagotavlja 2 do 3 cm^2 na ličinko. Razmerje med debelino usedline in globino vode nad njo mora biti

([1]) ASV v sladki vodi je pri 20 °C in standardnem atmosferskem tlaku 9,1 mg/l (60 % je enako 5,46 mg/l).

▼M6

približno 1: 4. Uporabiti je treba kletke za razmnoževanje (vsaka od treh mer mora biti najmanj 30 cm), ki imajo na vrhu in vsaj eni stranici gazo (velikost mreže je približno 1 mm) (glej Dodatek 5). V vsako kletko se za odlaganje jajčec postavi 2-litrska kristalizirka s preskusno vodo in usedlino. Tudi pri kristalizirki mora biti razmerje med debelino usedline in globino vode nad njo približno 1: 4. Ko se nizi jajčec poberejo iz kristalizirke, se prestavijo v 12-mestno mikrotitersko ploščo (en niz na vdolbinico, ki vsebuje vsaj 2,5 ml vode iz kristalizirke s primešano preskusno snovjo) in nato se plošče prekrijejo s pokrovom, da se prepreči znatno izhlapevanje. Uporabijo se lahko tudi druge posode, primerne za vzdrževanje nizov jajčec. Vse preskusne posode in druge naprave, ki bodo prišle v stik s preskusnim sistemom, razen mikrotiterskih plošč, morajo biti v celoti iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala (npr. politetrafluoroetilena).

Izbira vrst

12. Če je mogoče, naj se v preskusu uporabi vrsta *Chironomus riparius*. Uporabi se lahko tudi *C. yoshimatsui. C. dilutus* je prav tako primerna, vendar je z njo težje delati in zahteva daljše preskusno obdobje. Podrobnosti metod gojenja *C. riparius* so navedene v Dodatku 2. Informacije o pogojih gojenja do na voljo tudi za *C. dilutus* (5) in *C. yoshimatsui* (14). Identifikacijo vrst je treba potrditi pred preskušanjem, ni pa to potrebno pred vsakim preskusom, če organizmi prihajajo iz internega gojišča.

Usedlina

13. Če je mogoče, je treba uporabiti formulirano usedlino (imenovano tudi rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina). Če se uporabi naravna usedlina, je treba določiti njene značilnosti (vsaj pH in vsebnost organskega ogljika, priporoča se tudi določitev drugih parametrov, kot sta razmerje C/N in granulometrija), poleg tega ne sme biti onesnažena in ne sme vsebovati drugih organizmov, ki bi lahko tekmovali z ličinkami trzač ali jih požrli. Priporoča se tudi, da se usedline pred preskušanjem sedem dni kondicionirajo v preskusnih pogojih. Priporoča se naslednja formulirana usedlina, kot je opisana v (1), (1) (20) (21):

a. 4–5 % (suha teža) šote: čim bližje pH od 5,5 do 6,0; pomembno je uporabiti fino mleto šoto v prahu (velikost delcev ≤ 1 mm), sušeno le na zraku;

b. 20 % (suhe teže) kaolinske gline (vsebnost kaolinita po možnosti nad 30 %);

c. 75–76 % (suhe teže) kremenovega peska (prevladovati mora fini pesek, pri katerem je več kot 50 % delcev velikih od 50 do 200 μm);

d. doda se deionizirana voda, tako da je v končni mešanici vlaga 30–50-odstotna;

e. doda se kemijsko čist kalcijev karbonat ($CaCO_3$), da se pH v končni mešanici usedline uravna na 7,0 ± 0,5;

f. vsebnost organskega ogljika v končni mešanici mora biti 2 % (±0,5 %), uravnava pa se z ustreznimi količinami šote in peska v skladu s točkama (a) in (c).

14. Vir šote, kaolinske gline in peska mora biti znan. Preveriti je treba, da sestavine usedline niso kemično onesnažene (npr. da ne vsebujejo težkih

▼M6

kovin, organoklornih spojin, in organofosfornih spojin). Primer priprave formulirane usedline je opisan v Dodatku 3. Sprejemljiva je tudi mešanica suhih sestavin, če se dokaže, da se sestavine usedline po dodatku vode nad usedlino ne začnejo ločevati (npr. lebdenje šotnih delcev) in da je šota ali usedlina zadostno kondicionirana.

Voda

15. Za preskusno vodo je primerna vsaka voda, ki ustreza kemijskim značilnostim sprejemljive vode za redčenje, ki so navedene v dodatkih 2 in 4. Za gojiščno vodo in preskusno vodo je sprejemljiva vsaka primerna voda, naravna voda (površinska ali podzemna voda), modelna razredčevalna voda (glej Dodatek 2) ali deklorirana vodovodna voda, če trzače čas gojenja in preskušanja v njej preživijo brez znakov stresa. Na začetku preskusa mora biti pH preskusne vode med 6 in 9, skupna trdota pa ne sme biti večja od 400 mg/l kot $CaCO_3$. Če se domneva, da bo prišlo do interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno kemikalijo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto (v takem primeru se torej ne sme uporabiti medij Elendt M4). Ves čas študije je treba uporabljati isto vrsto vode. Značilnosti vode, navedene v Dodatku 4, je treba izmeriti vsaj dvakrat na leto ali kadar se sumi, da so se morda te značilnosti bistveno spremenile.

Založne raztopine – voda s primešano preskusno snovjo

16.a. Preskusne koncentracije se izračunajo na podlagi koncentracij v vodnem stolpcu, tj. vodi nad usedlino. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se običajno pripravijo z redčenjem založne raztopine. Založne raztopine je po možnosti treba pripraviti tako, da se preskusna snov raztopi v preskusni vodi. V nekaterih primerih bo morda treba uporabiti topila ali disperzijska sredstva, da se pripravi primerno koncentrirana založna raztopina. Primerna topila so na primer aceton, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetil formamid in trietilen glikol. Disperzijska sredstva, ki se lahko uporabijo, so Cremaphor RH40, Tween 80, metil celuloza 0,01 % in HCO-40. Koncentracija sredstva za raztapljanje v končnem preskusnem mediju mora biti minimalna (tj. $\leq$ 0,1 ml/l) in enaka v vseh posodah s preskusno kemikalijo. Če se uporabi sredstvo za raztapljanje, to ne sme bistveno vplivati na preživetje, kar se kaže s kontrolo s topilom, ki se primerja z negativno kontrolo (z vodo). Vendar si je treba čim bolj prizadevati, da se taki materiali ne uporabijo.

Založne raztopine – usedlina s primešano preskusno snovjo

16. b. Usedline s primešano preskusno snovjo izbrane koncentracije se običajno pripravijo z dodajanjem raztopine preskusne kemikalije neposredno v usedlino. Založna raztopina preskusne kemikalije, raztopljene v deionizirani vodi, se zmeša s formulirano usedlino z valjčnim mlinom, mešalnikom za krmo ali ročno. Če je preskusna kemikalija slabo topna v vodi, se lahko raztopi v čim manjši prostornini ustreznega organskega topila (npr. heksana, acetona ali kloroforma). Ta raztopina se nato zmeša z 10 g finega kremenovega peska za vsako preskusno posodo. Topilo lahko izhlapi in ga je treba v celoti odstraniti iz peska. Pesek se nato zmeša z ustrezno količino usedline. Za raztapljanje, razpršitev ali emulgiranje preskusne kemikalije se lahko uporabijo samo tista sredstva, ki hitro izhlapijo. Ne smemo pozabiti, da je treba pri pripravi usedline upoštevati

▼M6

količino peska, vnesenega z mešanico preskusne kemikalije in peska (tj. usedlino je torej treba pripraviti z manj peska). Paziti je treba, da je preskusna kemikalija, dodana usedlini, v njej temeljito in enakomerno razporejena. Po potrebi se lahko podvzorci analizirajo, da se ugotovi stopnja homogenosti.

NAČRT PRESKUSA

17. Načrt preskusa se nanaša na izbiro števila preskusnih koncentracij in razmikov med njimi, število posod za vsako koncentracijo, število ličink na posodo ter število kristalizirk in kletk za razmnoževanje. Načrti za EC_x, NOEC in mejni preskus so opisani v nadaljevanju.

Načrt za regresijsko analizo

18. S preskusom je treba zajeti učinkovito koncentracijo (EC_x,) in razpon koncentracije, v katerem je učinek preskusne kemikalije aktualen, da se končna točka ne ekstrapolira zunaj meja dobljenih podatkov. Izogibati se je treba ekstrapolaciji veliko pod najnižjo ali nad najvišjo koncentracijo. Predhoden preskus za določanje območja delovanja v skladu s preskusnima metodama C.27 in C.28 je lahko uporaben za izbiro primernega razpona preskusnih koncentracij.

19. Pri pristopu EC_x je za vsako koncentracijo potrebnih vsaj pet koncentracij in osem ponovitev. Za vsako koncentracijo je treba uporabiti dve kletki za razmnoževanje (A in B). Osem ponovitev se razdeli v dve skupini po štiri ponovitve za posamezno kletko za razmnoževanje. Ta združitev ponovitev je potrebna zaradi števila trzač, ki mora biti v kletki za zanesljivo oceno razmnoževanja. Vendar ima druga generacija ponovno osem ponovitev, ki se začnejo z izpostavljenimi populacijami v kletkah za razmnoževanje. Faktor med koncentracijami ne sme biti večji od 2 (izjema je dopustna, kadar naklon krivulje odmerek-učinek ni strm). Število ponovitev na posamezno posodo s preskusno kemikalijo se lahko zmanjša na šest (tri za vsako posodo za gojenje), če se poveča število preskusnih koncentracij z različnimi učinki. Povečanje števila ponovitev ali zmanjšanje velikosti razmikov med preskusnimi koncentracijami običajno vodi do ožjih intervalov zaupanja okrog EC_X.

Načrt za oceno NOEC

20. Pri pristopu NOEC je treba uporabiti pet preskusnih koncentracij z vsaj osmimi ponovitvami (štiri za vsako kletko za razmnoževanje, A in B), faktor med koncentracijami pa ne sme biti večji od 2. Število ponovitev mora zadostovati, da se zagotovi ustrezna statistična moč za ugotovitev 20-odstotne razlike v primerjavi s kontrolo pri 5-odstotni stopnji značilnosti (α = 0,05). Za hitrost razvoja, plodnost in fertilnost je običajno ustrezna analiza variance (ANOVA), ki ji sledi Dunnettov ali Williamsov preskus (22–25). Za koeficient preobrazbe in razmerje med spoloma je lahko ustrezen Cochran-Armitageev preskus, Fisherjev eksaktni preskus (z Bonferronijevim popravkom) ali Mantel-Haenszelov preskus.

Mejni preskus

21. Mejni preskus se lahko izvede (ena preskusna koncentracija in kontrola(-e)), če v neobveznem predhodnem preskusu za določanje območja delovanja do največje koncentracije ni bilo opaženih učinkov. Namen mejnega preskusa je pokazati, da se vsi strupeni učinki preskusne kemikalije opazijo pri količinah, ki so večje od preskušene mejne koncentracije. Za vodo se predlaga 100 mg/l, za usedlino pa 1 000 mg/kg (suha teža). Običajno je potrebnih vsaj osem ponovitev za tretirane in kontrolne

▼M6

posode. Izkazati je treba ustrezno statistično moč za ugotovitev 20-odstotne razlike v primerjavi s kontrolo pri 5-odstotni stopnji značilnosti (α = 0,05). Pri odzivih metrik (npr. hitrost razvoja) je t-preskus primerna statistična metoda, če podatki izpolnjujejo zahteve tega preskusa (normalnost, homogenost varianc). Če te zahteve niso izpolnjene, se lahko uporabi t-preskus za neenake variance ali neparametrični preskus, kot je Wilcoxon-Mann-Whitneyjev preskus. Pri koeficientu preobrazbe je primeren Fisherjev eksaktni preskus.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Priprava sistema vode in usedline (primešanje preskusne snovi v vodo)

22.a. Formulirana usedlina (glej odstavka 13– 14 in Dodatek 3) se doda v vse preskusne posode in v kristalizirko, da nastane plast usedline, debela vsaj 1,5 cm (v kristalizirki je lahko nekoliko tanjša), vendar ne debelejša od 3 cm. Doda se voda (glej odstavek 15), da razmerje med debelino usedline in globino vode ne presega 1: 4. Po pripravi preskusnih posod je treba sistem vode in usedline približno sedem dni prezračevati, preden se dodajo ličinke prvega stadija prve ali druge generacije (glej odstavek 14 in Dodatek 3). Sistem vode in usedline v kristalizirkah se med preskusom ne prezračuje, ker jim ni treba podpirati preživetja (nizi jajčec so zbrani že pred izvalitvijo). Da se preprečita ločevanje sestavin usedline in ponovna suspenzija finega materiala med dodajanjem preskusne vode v vodni stolpec, se lahko usedlina med točenjem vode prekrije s plastičnim pokrovom. Pokrov se nato takoj odstrani. Primerna so lahko tudi druga sredstva.

Priprava sistema vode in usedline (usedlina s primešano preskusno snovjo)

22. b. Usedline s primešano preskusno snovjo, pripravljene v skladu z odstavkom 16b, se vnesejo v posode, nad usedlino pa se doda voda, da je razmerje med prostornino usedline in vode 1: 4. Plast usedline mora biti debela od 1,5 do 3 cm (v kristalizirki je lahko nekoliko tanjša). Da se prepreči ločevanje sestavin usedline in ponovna suspenzija finega materiala med dodajanjem preskusne vode v vodni stolpec, se lahko usedlina med točenjem vode prekrije s plastičnim pokrovom, ki se takoj nato odstrani. Primerna so lahko tudi druga sredstva. Ko je usedlina s primešano preskusno snovjo in vodo nad njo pripravljena, je zaželeno, da se omogoči razdelitev preskusne kemikalije iz usedline v vodno fazo (4) (5) (7) (18). To je po možnosti treba storiti v temperaturnih in prezračevalnih pogojih, ki bodo uporabljeni v preskusu. Ustrezen čas za uravnoteženje je odvisen od usedline in kemikalije, lahko pa traja od več ur do več dni in v redkih primerih do pet tednov. Ker bi bil tako na voljo čas za razgradnjo številnih kemikalij, se na uravnoteženje ne sme čakati, ampak se za to priporoča 48-urno obdobje. Vendar se lahko čas za uravnoteženje podaljša, če je znano, da je razpolovna doba razgradnje kemikalije v usedlini dolga (glej odstavek 8). Po koncu tega dodatnega obdobja za uravnoteženje je treba izmeriti koncentracijo preskusne kemikalije v vodi nad usedlino, porni vodi in usedlini vsaj pri najvišji in nižji koncentraciji (glej odstavek 38). Te analitske določitve preskusne kemikalije omogočajo izračun masne bilance in izražanje rezultatov na podlagi izmerjenih koncentracij.

23. Preskusne posode je treba pokriti (npr. s steklenimi ploščami). Po potrebi se lahko med študijo voda dotoči do prvotne prostornine, da se nadomesti izhlapevanje. Za to je treba uporabiti destilirano ali deionizirano vodo, da se prepreči kopičenje soli. Kristalizirke v kletkah za razmnoževanje niso

▼M6

pokrite in se lahko, vendar ni nujno, prilagodijo, da se nadomesti izguba vode v preskusnem obdobju, saj so nizi jajčec v stiku z vodo samo približno en dan, kristalizirke pa se uporabljajo le v kratki fazi preskusa.

Dodajanje preskusnih organizmov

24. Štiri do pet dni pred dodajanjem ličink prvega stadija za prvo generacijo je treba jajčna legla vzeti iz kulture in jih vstaviti v majhne posode v gojišču. Uporabi se lahko starejši medij iz založne kulture ali sveže pripravljeni medij. V vsakem primeru je treba v gojišče dodati majhno količino hrane, npr. nekaj kapljic filtrata iz fino mlete suspenzije ribje hrane v kosmičih (glej Dodatek 2). Uporabiti je treba samo sveže odložena jajčna legla. Ličinke se običajno izvalijo nekaj dni po tem, ko so bila jajčeca odločena (2 do 3 dni za *C. riparius* pri 20 °C ter 1 do 4 dni za *C. dilutus* pri 23 °C in *C. yoshimatsui* pri 25 °C), rast ličink pa poteka v štirih stadijih, od katerih vsak traja 4–8 dni. V preskusu je treba uporabiti ličinke prvega stadija (največ 48 ur po tem, ko se izvalijo). Stadij ličink bi se morda lahko preveril z merjenjem širine glave (7).

25. Dvajset ličink prvega stadija za prvo generacijo se s topo pipeto naključno vnese v vsako preskusno posodo, ki vsebuje sistem z vodo in usedlino. Med dodajanjem ličink v preskusne posode se ustavi prezračevanje vode, ki se ne sme izvajati še 24 ur potem, ko so bile ličinke dodane (glej odstavek 32). Glede na uporabljeni načrt preskusa (glej odstavka 19 in 20) je število uporabljenih ličink na koncentracijo vsaj 120 (6 ponovitev na koncentracijo) za pristop EC_X in 160 za pristop NOEC (8 ponovitev na koncentracijo). Pri načrtu z usedlino s primešano preskusno snovjo se izpostavljenost začne z vnosom ličink.

Primešanje preskusne snovi v vodo nad usedlino

26. Štiriindvajset ur po vnosu ličink prvega stadija za prvo generacijo se preskusna kemikalija primeša v vodni stolpec nad usedlino, pri čemer se ponovno zagotovi rahlo prezračevanje (za mogoče spremembe načrta preskusa glej odstavek 7). Pod vodno gladino se s pipeto vnesejo majhne prostornine založnih raztopin preskusne kemikalije. Vodo nad usedlino je nato treba premešati, pri čemer je treba paziti, da se ne premeša še usedlina. Pri načrtu z vodo s primešano preskusno snovjo se izpostavljenost začne s primešanjem preskusne snovi v vodo (tj. en dan po vnosu ličink).

Zbiranje preobraženih odraslih osebkov

27. Preobražene trzače prve generacije se iz preskusnih posod zberejo vsaj enkrat, bolje pa dvakrat na dan (glej točko 36) z aspiratorjem, sesalnikom ali podobno napravo (glej Dodatek 5). Paziti je treba, da se odrasli osebki na poškodujejo. Zbrane trzače iz štirih preskusnih posod v okviru enega tretiranja se vnesejo v kletke za razmnoževanje, ki so jim bile predhodno dodeljene. Na dan prve preobrazbe (samca) se v kristalizirke pod vodno gladino s pipeto primeša majhna prostornina založne raztopine preskusne kemikalije (načrt z vodo s primešano preskusno snovjo). Vodo nad usedlino je nato treba premešati, pri čemer je treba paziti, da se ne premeša še usedlina. Koncentracija preskusne kemikalije v kristalizirki je običajno enaka kot v posodah za tretiranje, ki so dodeljene določeni kletki za

▼M6

razmnoževanje. Pri načrtu z usedlino s primešano preskusno snovjo se kristalizirke pripravijo približno 11. dan po začetku izpostavljenosti (tj. vnosu ličink prve generacije), da se lahko ravnotežje vzpostavi približno 48 ur pred prvim odlaganjem nizov jajčec.

28. Nizi jajčec se zberejo iz kristalizirke v kletki za razmnoževanje s pinceto ali topo pipeto. Vsak niz jajčec se vnese v posodo z gojiščem iz kristalizirke, iz katere je bil odvzet (npr. iz vdolbinice 12-mestne mikroplošče skupaj z vsaj 2,5 ml medija). Posode z nizi jajčec so pokrite s pokrovom, da se prepreči znatno izhlapevanje. Nizi jajčec se opazujejo vsaj šest dni po tem, ko so nastali, da se lahko razvrstijo kot fertilni ali nefertilni.

Za začetek druge generacije se iz vsake kletke za razmnoževanje izberejo trije ali bolje šest fertilnih nizov jajčec skupaj z nekaj hrane, ki omogoča izvalitev. Ti nizi jajčec bi morali nastati na vrhuncu obdobja odlaganja jajčec, ki se v kontrolah običajno pojavi okrog 19. dne preskusa. V idealnih pogojih se druga generacija vseh tretiranj začne na isti dan, vendar zaradi učinkov na razvoj ličink, povezanih s kemikalijami, to ni vedno mogoče. V takem primeru se lahko v višjih koncentracijah začne pozneje kot v tretiranjih z nižjimi koncentracijami in v kontroli (s topilom).

29. a. Pri načrtu z vodo s primešano preskusno snovjo se sistem z vodo in usedlino za drugo generacijo pripravi s primešanjem preskusne kemikalije v vodni stolpec nad usedlino približno 1 uro pred vnosom ličink prvega stadija v preskusne posode. Pod vodno gladino se s pipeto vnesejo majhne prostornine raztopin preskusne kemikalije. Vodo nad usedlino je nato treba premešati, pri čemer je treba paziti, da se ne premeša tudi usedlina. Po primešanju preskusne snovi se zagotovi rahlo prezračevanje.

29. b. Pri načrtu z usedlino s primešano preskusno snovjo se posode za izpostavljanje, ki vsebujejo sistem vode in usedline, za drugo generacijo pripravijo enako kot za prvo generacijo.

30. Dvajset ličink prvega stadija (največ 48 ur po tem, ko se izvalijo) druge generacije se s topo pipeto nakljućno vnese v vsako preskusno posodo, ki vsebuje sistem z vodo in usedlino s primešano preskusno snovjo. Med dodajanjem ličink prvega stadija v preskuse posode se ustavi prezračevanje vode, ki se ne sme izvajati še 24 ur potem, ko so bile ličinke dodane. Glede na uporabljeni načrt preskusa (glej odstavka 19 in 20) je število uporabljenih ličink na koncentracijo vsaj 120 (6 ponovitev na koncentracijo) za pristop EC_X in 160 za pristop NOEC (8 ponovitev na koncentracijo).

Hrana

31. Ličinke v preskusnih posodah je treba hraniti po možnosti vsak dan ali vsaj trikrat na teden. Ustrezna količina hrane za mlade ličinke v prvih 10 dneh njihovega razvoja je 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg za *C. yoshimatsui*) ribje hrane (suspenzija v vodi ali fino mleta hrana, npr. Tetra-Min ali Tetra-Phyll; glej podrobnosti v Dodatku 2) na ličinko na dan. Starejše ličinke lahko potrebujejo nekoliko več hrane: 0,5– 1,0 mg na ličinko na dan mora biti dovolj za preostanek preskusa. Obrok hrane je treba zmanjšati v vseh tretiranih vzorcih in kontrolah, če se opazi rast plesni ali smrtnost v kontrolah. Če razvoja plesni ni mogoče ustaviti, je treba preskus ponoviti.

Toksikološki pomen izpostavljenosti z zaužitjem je običajno večji pri kemikalijah z visoko afiniteto do organskega ogljika ali kemikalij, ki se kovalentno vežejo na usedlino. Zato se lahko pri preskušanju kemikalij s

▼M6

takimi lastnostmi količina hrane, potrebna za zagotovitev preživetja in naravno rast ličink, doda formulirani usedlini pred obdobjem stabilizacije, kar je odvisno od regulativnih zahtev. Da se prepreči poslabšanje kakovosti vode, je treba namesto ribje hrane uporabiti rastlinski material, npr. dodajanje 0,5 % (suhe teže) fino mletega listja velike koprive (*Urtica dioica*), bele murve (*Morus alba*), plazeče detelje (*Trifolium repens*), špinače (*Spinacia oleracea*) ali drugega rastlinskega materiala (*Cerophyl* ali *α*-celuloza). Dodajanje celotnega obroka vira organske hrane v usedlino pred primešanjem preskusne snovi ni niti nepomembno glede na kakovost vode in biološko učinkovitost (21) niti standardizirana metoda, vendar so nedavne študije dokazale, da ta metoda deluje (19) (26). Odraslih trzač v kletki za razmnoževanje običajno ni treba hraniti, vendar se plodnost in fertilnost povečata, če se jim kot vir hrane za odrasle preobražene osebke zagotovi vatna blazinica, namočena v nasičeno raztopino saharoze (34).

Pogoji inkubacije

32. Rahlo prezračevanje vode nad usedlino v preskusnih posodah se zagotavlja 24 ur po vnosu ličink prvega stadija obeh generacij in se izvaja ves čas preskusa (paziti je treba, da koncentracija raztopljenega kisika ne pade pod 60 % ASV). Prezračevanje se zagotavlja prek steklene pasteurjeve pipete, katere izhod je pritrjen 2 do 3 cm nad plastjo usedline in ki ustvarja nekaj mehurčkov na sekundo. Pri preskušanju hlapnih kemikalij je treba upoštevati, da se sistem z vodo in usedlino ne prezračuje, medtem ko je treba hkrati izpolniti merilo za veljavnost najmanj 60 % ASV (odstavek 10). Več smernic je na voljo v (16).

33. Preskus s *C. riparius* se izvaja pri konstantni temperaturi 20 °C (± 2 °C). Za *C. dilutus* in *C. yoshimatsui* sta priporočeni temperaturi 23 °C oziroma 25 °C (± 2 °C). Uporablja se 16-urno obdobje osvetljenosti, jakost svetlobe pa mora biti od 500 do 1 000 luksov. Pri kletkah za razmnoževanje se lahko doda ena ura faze svitanja in mraka.

Trajanje izpostavljenosti

34. Načrt z vodo s primešano preskusno snovjo: obdobje izpostavljenosti se pri prvi generaciji začne, ko se preskusna kemikalija primeša v vodo nad usedlino v preskusni posodi (to je en dan po vnosu ličink; za mogoče spremembe načrta izpostavljenosti glej odstavek 7). Izpostavljenost druge generacije ličink se začne takoj, ker se vnesejo v sistem z vodo in usedlino, v katerega je bila preskusna snov že primešana. Najdaljše trajanje izpostavljenosti pri *C. riparius* in *C. yoshimatui* je za prvo generacijo 27 dni, za drugo generacijo pa 28 dni (ličinke prve generacije preživijo en dan v posodah brez izpostavljenosti). Glede na prekrivanje celoten preskus traja približno 44 dni. Pri *C. dilutus* je najdaljše trajanje izpostavljenosti 64 dni za prvo generacijo oziroma 65 dni za drugo generacijo. Preskus traja skupaj približno 100 dni.

Načrt z usedlino s primešano preskusno snovjo: izpostavljenost se začne z vnosom ličink in traja najdlje 28 dni za obe generaciji pri *C. riparius* in *C. yoshimatsui* ter največ 65 dni za obe generaciji pri *C. dilutus*.

Opažanja

Preobrazba

35. Določita se čas razvoja ter skupno število v celoti preobraženih in živih samcev in samic trzače za obe generaciji. Samce je mogoče preprosto prepoznati po pahljačastih tipalkah in drži vitkega telesa.

▼M6

36. Preskusne posode obeh generacij je treba opazovati vsaj trikrat na teden, da se vizualno oceni kakršno koli neobičajno obnašanje (npr. zapuščanje usedline, nenavadno plavanje) v primerjavi s kontrolo. V obdobju preobrazbe, ki se pri *C. riparius* in *C. yoshimatsui* začne približno 12 dni po vnosu ličink (20 dni po vnosu pri *C. dilutus*) se preobražene trzače preštejejo in opredelijo po spolu vsaj enkrat na dan, priporočljivo pa je dvakrat na dan (zgodaj zjutraj in pozno popoldne). Po identifikaciji se trzače prve generacije previdno odstranijo iz posod in prenesejo v kletko za razmnoževanje. Trzače druge generacije se odstranijo in po identifikaciji usmrtijo. Vse nize jajčec, odložene v preskusnih posodah prve generacije, je treba zbrati posamezno in jih prenesti z vsaj 2,5 ml naravne vode v 12-mestne mikroplošče (ali druge primerne posode), ki so pokrite s pokrovom, da se prepreči znatno izhlapevanje. Zabeležiti je treba tudi število mrtvih ličink in vidnih bub, ki se niso preobrazile. Primeri kletke za razmnoževanje, preskusne posode in sesalnika so navedeni v Dodatku 5.

Razmnoževanje

37. Učinki na razmnoževanje se ocenijo s številom nizov jajčec, ki jih odložijo trzače prve generacije, ter njihovo fertilnostjo. Nizi jajčec se enkrat na dan zberejo iz kristalizirke, ki je v vsaki posodi za gojenje. Nize jajčec je treba zbrati in prenesti z vsaj 2,5 ml naravne vode v 12-mestne mikroplošče (en niz jajčec v eno vdolbinico) ali druge primerne posode, ki so pokrite s pokrovom, da se prepreči znatno izhlapevanje. Za vsak niz jajčec se dokumentirajo naslednje lastnosti: dan odlaganja, velikost (normalna, tj. 1,0 ± 0,3 cm, ali majhna, običajno ≤ 0,5 cm) in struktura (običajna = oblika banane s spiralnim nizom jajčec ali nenormalna, npr. niz jajčec, ki ni v obliki spirale) ter fertilnost (fertilen ali nefertilen). Fertilnost niza jajčec se oceni v šestih dneh po tem, ko je bil odložen. Niz jajčec se šteje za fertilen, če se izvali vsaj ena tretjina jajčec. Skupno število samic, dodanih v kletko za razmnoževanje, se uporabi za izračun števila nizov jajčec na samico in število fertilnih nizov jajčec na samico. Po potrebi se lahko število jajčec v nizu jajčec oceni nedestruktivno z uporabo metode krožnega štetja (podrobno opisana v 32 in 33).

Analitske meritve

Koncentracija preskusne kemikalije

38. Na začetku (v primeru primešanja preskusne snovi v vodo po možnosti eno uro po vnosu preskusne snovi) in koncu preskusa je treba analizirati vsaj vzorce vode nad usedlino, porne vode in usedline, in sicer pri najvišji in nižji koncentraciji. To velja za posode iz obeh generacij. Iz kristalizirk v kletki za razmnoževanje se analizira samo voda nad usedlino, ker pridejo v stik z njo nizi jajčec (pri načrtu z usedlino s primešano preskusno snovjo se lahko predvidi analitska potrditev koncentracije usedline). Po potrebi se lahko med preskusom izvedejo nadaljnje meritve usedline, porne vode ali vode nad usedlino. Te določitve koncentracije preskusne snovi pokažejo obnašanje/porazdelitev preskusne kemikalije v sistemu vode in usedline. Za vzorčenje usedline in porne vode na začetku preskusa in med njim (glej odstavek 39) so potrebne dodatne preskusne posode za izvedbo analitskega določanja. Meritve usedline pri načrtu z

▼M6

vodo s primešano preskusno snovjo morda ne bodo potrebne, če je bila porazdelitev preskusne kemikalije med vodo in usedlino jasno določena v študiji vode/usedline v primerljivih pogojih (npr. razmerje med usedlino in vodo, vrsta vnosa, vsebnost organskega ogljika v usedlini) ali če je bilo dokazano, da izmerjene koncentracije v vodi nas usedlino ostajajo v razponu od 80 do 120 % nominalnih ali izmerjenih začetnih koncentracij.

39. Kadar se izvajajo vmesne meritve (npr. 7. in/ali 14. dan) in če so za analize potrebni veliki vzorci, ki jih ni mogoče odvzeti iz preskusnih posod, ne da bi to vplivalo na preskusni sistem, je treba analitske določitve izvesti na vzorcih iz dodatnih preskusnih posod, ki se tretirajo enako (vključno s prisotnostjo preskusnih organizmov), vendar se za biološka opažanja ne uporabljajo.

40. Za izolacijo intersticijske (= porne) vode se priporoča 30-minutno centrifugiranje pri npr. 10 000 g in 4 °C. Če pa se za preskusno kemikalijo izkaže, da se ne adsorbira na filtre, je sprejemljivo tudi filtriranje. V nekaterih primerih morda koncentracij v porni vodi zaradi premajhne prostornine v vzorcu ne bo mogoče analizirati.

Fizikalno-kemijski parametri

41. Ustrezno je treba izmeriti pH, raztopljeni kisik v preskusni vodi ter temperaturo vode v preskusnih posodah in kristalizirkah (glej odstavek 10). Na začetku in koncu preskusa je treba v kontrolah ter eni preskusni posodi in kristalizirki izmeriti trdoto in amoniak pri najvišji koncentraciji.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

42. Namen tega preskusa življenjskega cikla je določiti učinek preskusne kemikalije na razmnoževanje ter hitrost razvoja in skupno število v celoti preobraženih in živih samcev in samic trzače za dve generaciji. Za podatke o koeficientu preobrazbe je treba združiti samce in samice. Če ni statistično znatnih razlik med občutljivostjo obeh spolov v zvezi s hitrostjo razvoja, se lahko rezultati za samce in samice združijo za statistično analizo.

43. Učinkovite koncentracije, izražene kot koncentracije v vodi nad usedlino (za vodo s primešano preskusno snovjo) ali v usedlini (za usedlino s primešano preskusno snovjo), se običajno izračunajo na podlagi koncentracij, izmerjenih na začetku izpostavljenosti (glej odstavek 38). Za vodo s primešano preskusno snovjo se zato za vsako tretiranje izračuna povprečna vrednost koncentracij, običajno izmerjenih na začetku izpostavljenosti v vodi nad usedlino v posodah za obe generaciji in v kristalizirkah. Za usedlino s primešano preskusno snovjo se zato za vsako tretiranje izračuna povprečna vrednost koncentracij, običajno izmerjenih na začetku izpostavljenosti v posodah za obe generaciji (in neobvezno v kristalizirkah).

44. Za izračun točkovne ocene, tj. EC_x, se lahko statistični podatki po posodah in kletkah za razmnoževanje uporabijo kot dejanske ponovitve. Pri izračunu intervala zaupanja za EC_x je treba upoštevati variabilnost med posodami ali pa dokazati, da je ta zanemarljiva. Če se model prilega po metodi najmanjših kvadratov, je treba statistične podatke po posameznih posodah transformirati, da se izboljša homogenost variance. Vendar je treba vrednosti EC_x izračunati po tem, ko so bili rezultati transformirani nazaj na prvotno vrednost (31).

▼M6

45. Kadar je namen statistične analize določiti NOEC s preskušanjem domnev, je treba upoštevati variabilnost med posodami, kar se zagotovi z uporabo metod analize variance (npr. postopki Williamsovega in Dunnettovega preskusa). Williamsov preskus bi bil ustrezen, če se v teoriji pričakuje monotono razmerje odmerek-učinek, Dunnettov preskus pa bi bil ustrezen, kadar domneva o monotonosti ne drži. Namesto tega se lahko uporabijo robustnejši preskusi (27), kadar so običajne predpostavke analize variance kršene (31).

Koeficient preobrazbe

46. Koeficienti preobrazbe so kvantni podatki in se lahko analizirajo s Cochran-Armitageovim preskusom, uporabljenim regresivno (step-down), kadar se pričakuje monotono razmerje med odmerek-učinek in so ti podatki v skladu s tem pričakovanjem. Če niso, se lahko uporabi Fisherjev eksaktni preskus ali Mantel-Haenszelov preskus z Bonferroni-Holmovimi popravljenimi vrednostmi p. Če se izkaže, da je variabilnost med ponovitvami v okviru iste koncentracije večja, kot bi kazala binomska porazdelitev (pogosto imenovana „ekstra-binomska“ variacija), potem je treba uporabiti robustni Cochran-Armitageev preskus ali Fisherjev eksaktni preskus, kot je predlagano v (27).

Vsota preobraženih živih trzač (samcev in samic) na posodo, n_e, se določi in deli s številom vnesenih ličink, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

pri čemer je:

ER = koeficient preobrazbe,

n_e = število preobraženih živih trzač na posodo,

n_a = število vnesenih ličink na posodo (običajno 20).

Če je n_e večje kot n_a (tj. če je bilo nenamerno vnesenih več ličink, kot je bilo predvideno), je treba n_a izenačiti z n_e.

47. Alternativen pristop v primeru ekstra-binomske variacije, ki je ustreznejši za večje vzorce, je obravnavanje koeficienta preobrazbe kot zveznega odziva in uporaba postopkov, ki so skladni s temi podatki o ER. Velik vzorec je tu opredeljen kot število preobraženih osebkov in število nepreobraženih osebkov po posameznih ponovitvah (posodah), pri čemer je obojih več kot pet.

48. Za uporabo metod analize variance je treba vrednosti ER najprej transformirati z arkus sinus-korensko transformacijo ali Tukey-Freemanovo transformacijo, da se dobi približna normalna porazdelitev in da se variance izenačijo. Cochran-Armitageev preskus, Fisherjev eksaktni preskus (Bonferroni) ali Mantel-Haenszelov preskus se lahko uporabi, kadar se uporabljajo absolutne pogostosti. Pri arkus sinus-korenski transformaciji se izračuna arkus sinus ($\sin^{-1}$) kvadratnega korena ER.

49. Za koeficiente preobrazbe se vrednosti EC_x izračunajo z regresijsko analizo (npr. probit, logit ali Weibullov model (28)). Če regresijska analiza ni uspešna (npr. kadar sta manj kot dva delna odgovora), se lahko uporabijo druge neparametrične metode, kot sta drseče povprečje ali linearna interpolacija.

Hitrost razvoja

50. Srednji čas razvoja predstavlja srednji časovni razpon med vnosom ličink (dan 0 preskusa) in pojavom eksperimentalne kohorte trzač (za izračun

▼M6

dejanskega časa razvoja je treba upoštevati starost ličink ob vnosu). Hitrost razvoja (enota: (1/dan) je obratna času razvoja in predstavlja tisti delež razvoja ličink, ki se zgodi na dan. Za oceno teh raziskav strupenosti v usedlini je primernejša hitrost razvoja, saj je njena varianca manjša, poleg tega je bolj homogena in bližje normalni porazdelitvi v primerjavi s časom razvoja. Zato se lahko namesto časa razvoja za hitrost razvoja uporabijo učinkovitejši postopki parametričnega preskusa. Če se hitrost razvoja obravnava kot zvezni odziv, se lahko vrednosti EC_x ocenijo z regresijsko analizo (npr. (29) (30)). NOEC za srednjo hitrost razvoja se lahko določi z metodami analize variance, npr. Williamsovim ali Dunnettovim preskusom. Ker se samci preobrazijo hitreje od samic, tj. njihova hitrost razvoja je večja, je smiselno poleg hitrosti razvoja vseh trzač skupaj izračunati tudi hitrost razvoja za vsak spol ločeno.

51. Za statistično preskušanje se za število trzač, opaženih na dan opazovanja x, domneva, da so se preobrazile na sredini časovnega intervala med dnevom x in dnevom x – 1 (l = dolžina intervala opazovanja, običajno 1 dan). Srednja hitrost razvoja na posodo ($\overline{x}$) se izračuna z enačbo:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

pri čemer je:

$\overline{x}$: srednja hitrost razvoja za posodo,

i: indeks intervala opazovanja,

m: največje število intervalov opazovanja,

f_i: število trzač, preobraženih v intervalu opazovanja i,

n_e: skupno število preobraženih trzač ob koncu poskusa (Σf_i),

x_i: hitrost razvoja trzač, preobraženih v intervalu i,

$$x_i = 1/\mathrm{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

pri čemer je:

day_i: dan opazovanja (dnevi od vnosa ličink),

l_i: dolžina intervala opazovanja i (dnevi, običajno 1 dan).

Razmerje med spoloma

52. Razmerja med spoloma so kvantni podatki in jih je zato treba oceniti s Ficherjevim eksaktnim preskusom ali drugimi ustreznimi metodami. Naravno razmerje med spoloma pri *C. riparius* je ena, tj. samci in samice so enako pogosti. Podatke o razmerju med spoloma je treba obravnavati enako za obe generaciji. Ker je največje število trzač na posodo (tj. 20) premajhno za smiselno statistično analizo, se sešteje skupno število v

▼M6

celoti preobraženih in živih trzač za posamezen spol v vseh posodah enega tretiranja. Ti netransformirani podatki se preskusijo glede na podatke iz kontrole (s topilom) ali združene kontrole v kontingenčni tabeli 2 × 2.

Razmnoževanje

53. Razmnoževanje se tako kot plodnost izračuna kot število nizov jajčec na samico. To natančneje pomeni, da se skupno število nizov jajčec, odloženih v kletki za razmnoževanje, deli s skupnim številom živih in nepoškodovanih samic, dodanih v navedeno kletko. NOEC za plodnost se lahko določi z metodami analize variance, npr. Williamsovim ali Dunnettovim preskusom.

54. Fertilnost nizov jajčec se uporabi za kvantifikacijo števila fertilnih nizov jajčec na samico. Skupno število nizov jajčec, odloženih v kletki za razmnoževanje, se deli s skupnim številom živih in nepoškodovanih samic, dodanih v navedeno kletko. NOEC za fertilnost se lahko določi z metodami analize variance, npr. Williamsovim ali Dunnettovim preskusom.

Poročilo o preskusu

55. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti (topnost v vodi, parni tlak, log K_{ow}, porazdelitveni koeficient v tleh (ali v usedlini, če je na voljo), stabilnost v vodi in usedlini itd.),

— kemijski identifikacijski podatki (splošno ime, kemijsko ime, strukturna formula, številka CAS itd.), vključno s čistostjo in analitsko metodo za kvantifikacijo preskusne kemikalije.

Preskusne vrste:

— uporabljeni preskusni organizmi: vrsta, znanstveno ime, vir organizmov in pogoji razmnoževanja,

— informacije o ravnanju z jajčnimi legli in ličinkami,

— informacije o ravnanju s preobraženimi odraslimi osebki prve generacije s pomočjo sesalnika itd. (glej Dodatek 5),

— starost preskusnih organizmov ob vnosu v preskusne posode za prvo in drugo generacijo.

Preskusni pogoji:

— uporabljena usedlina, tj. naravna ali formulirana (umetna),

— naravna usedlina: lokacija in opis mesta vzorčenja usedline, vključno, če je mogoče, s preteklim onesnaženjem; značilnosti usedline: pH, vsebnost organskega ogljika, razmerje C/N in granulometrija (če je ustrezno),

— formulirana usedlina: priprava, sestavine in značilnosti (vsebnost organskega ogljika, pH, vlaga itd., izmerjeni na začetku preskusa),

— priprava preskusne vode (če se uporablja modelna razredčevalna voda) in značilnosti (koncentracija kisika, pH, trdota itd., izmerjeni na začetku preskusa),

▼M6

— globina usedline in vode nad njo v preskusnih posodah in kristalizirkah,

— prostornina vode nad usedlino in porne vode; teža mokre usedline s porno vodo in brez nje v preskusnih posodah in kristalizirkah,

— preskusne posode (material in velikost),

— kristalizirke (material in velikost),

— kletke za razmnoževanje (material in velikost),

— način priprave založnih raztopin in preskusnih koncentracij za preskusne posode in kristalizirke,

— vnos preskusne kemikalije v preskusne posode in kristalizirke: preskusne koncentracije, število ponovitev in topil, če so potrebna,

— pogoji inkubacije za preskusne posode: temperatura, svetlobni cikel in jakost, prezračevanje (mehurčki na sekundo),

— pogoji inkubacije za kletke za razmnoževanje in kristalizirke: temperatura, svetlobni cikel in jakost svetlobe,

— pogoji inkubacije za nize jajčec v mikroploščah (ali drugih posodah): temperatura, svetlobni cikel in jakost svetlobe,

— podrobne informacije o hranjenju, vključno z vrsto hrane, pripravo, količino in načinom.

Rezultati:

— nazivne preskusne koncentracije, izmerjene preskusne koncentracije in rezultati vseh analiz za določitev koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah in kristalizirkah,

— kakovost vode v preskusnih posodah in kristalizirkah, tj. pH, temperatura, raztopljeni kisik, trdota in amoniak,

— morebitna nadomestitev izhlapele preskusne vode v preskusnih posodah,

— število preobraženih samcev in samic trzače na posodo ter na dan za prvo in drugo generacijo,

— razmerje med spoloma pri v celoti preobraženih in živih trzačah na tretiranje za prvo in drugo generacijo,

— število ličink, ki se niso preobrazile v trzače, na posodo za prvo in drugo generacijo,

— odstotek/delež preobrazbe na ponovitev in preskusno koncentracijo (združeni samci in samice trzače) za prvo in drugo generacijo,

— srednja hitrost razvoja v celoti preobraženih in živih trzač na ponovitev in stopnjo koncentracije (združeni samci in samice trzače) za prvo in drugo generacijo,

— število nizov jajčec, odloženih v kristalizirkah, na kletko za razmnoževanje in dan,

▼**M6**

— lastnosti posameznega niza jajčec (velikost, oblika in fertilnost),

— plodnost – skupno število nizov jajčec na skupno število samic, dodanih v kletko za razmnoževanje,

— fertilnost – skupno število fertilnih nizov jajčec na skupno število samic, dodanih v kletko za razmnoževanje,

— ocene strupenih končnih točk, npr. EC_x (in s tem povezani intervali zaupanja), NOEC ter statistične metode, uporabljene za njihovo določitev,

— razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izvirajo iz odstopanj od te preskusne metode.

LITERATURA

(1) Poglavje C.28 te priloge, Preskus strupenost s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo vode s primešano preskusno snovjo.

(2) Shobanov, N. A., Kiknadze, I. I., in Butler, M. G. (1999). Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R., idr. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. Avgust 1994. WRc, Združeno kraljestvo.

(4) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, z delavnice WOSTA, ki je potekala na Nizozemskem.

(5) ASTM International (2009). E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. V: Annual Book of ASTM Standards, Zvezek 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, december 1997.

(7) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, druga izdaja, EPA 600/R-99/064, marec 2000, sprememba prve izdaje iz junija 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996). Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996). Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K. E., McLeay, D. J., in Kirby, R. S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.

(11) Norberg-King, T. J., Sibley, P. K., Burton, G. A., Ingersoll, C. G., Kemble, N. E., Ireland, S., Mount, D. R., in Rowland, C. D. (2006). Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662–2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V., in Weltje, L. (2007). Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221–230.

(13) Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345–350.

(14) Kawai, K. (1986). Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47–57.

(15) Poglavje C.27 te priloge, Preskus strupenosti s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo usedline s primešano preskusno snovjo.

(16) OECD (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Pariz.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M., in Hamer, M. (2010). The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, september 1995.

(19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T., in Oehlmann, J. (2005). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353–361.

(20) Suedel, B. C., in Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163– 1175.

(21) Naylor, C., in Rodrigues, C. (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291–3303.

(22) Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096– 1121.

(23) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482–491.

(24) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103– 117.

(25) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T. G., Ratte, H. T., Shinn, C., Weltje, L., in Maes, H. M. (2009). Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94– 102.

(27) Rao, J. N. K., in Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577–585.

(28) Christensen, E. R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213–221.

▼**M6**

(29) Bruce, R. D., in Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485– 1494.

(30) Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298–312.

(31) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application,* OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 str., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Pariz.

(32) Benoit, D. A., Sibley, P. K., Juenemann, J. L., in Ankley, G. T. (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165– 1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. in Oehlmann, J. (2007). Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1–9.

(34) OECD (2010). Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Pariz.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve

Za to preskusno metodo se uporabljajo naslednje opredelitve pojmov:

Kemikalija je snov ali zmes.

Formulirana usedlina ali rekonstituirana, umetna ali sintetična usedlina je zmes snovi, uporabljenih za posnemanje fizičnih sestavin naravne usedline.

Voda nad usedlino je voda, ki se nalije nad usedlino v preskusni posodi.

Intersticijska voda ali porna voda je voda, ki zavzema prostor med delci usedline in tal.

Voda s primešano preskusno snovjo je preskusna voda, ki ji je bila dodana preskusna kemikalija.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

▼M6

Dodatek 2

Priporočila za gojenje *Chironomus riparius*

1. Ličinke *Chironomus* se lahko gojijo v kristalizirkah ali večjih posodah. Na dno posode se nanese tanka plast finega kremenovega peska (debela približno od 5 do 10 mm). Za primeren substrat se je izkazal tudi kieselgur (npr. Merck, Art 8117) (zadošča tanjša plast, debela samo nekaj mm). Nato se doda primerna voda do globine več cm. Vodo je treba po potrebi dotočiti, da se nadomestijo izgube zaradi izhlapevanja in prepreči izsušitev. Voda se po potrebi lahko zamenja. Zagotoviti je treba rahlo prezračevanje. Posode, v katerih se gojijo ličinke, morajo biti v primerni kletki, ki bo preprečila pobeg odraslih preobraženih osebkov. Kletka mora biti dovolj velika, da lahko preobraženi odrasli osebki rojijo, sicer se lahko zgodi, da ne bo parjenja (najmanjša velikost je približno 30 × 30 × 30 cm).

2. Kletke morajo biti v prostoru s sobno temperaturo ali prostoru s konstantnim ozračjem pri 20 ± 2 °C s 16-urnim obdobjem osvetljenosti (jakost približno 1 000 luksov) in 8 urami teme. Po poročilih lahko manj kot 60-odstotna relativna vlažnost zraka ovira razmnoževanje.

Voda za redčenje

3. Uporabi se lahko vsaka primerna naravna ali sintetična voda. Običajno se uporabljajo voda iz vodnjaka, deklorirana vodovodna voda in umetni mediji (npr. medij Elendt „M4“ ali „M7“, glej v nadaljevanju). Vodo je treba pred uporabo prezračevati. Voda za gojenje se lahko po potrebi obnovi, tako da se uporabljena voda iz posod za gojenje skrbno pretoči ali izsesa, ne da bi se pri tem uničil ovoj ličink.

Hranjenje ličink

4. Ličinke *Chironomus* je treba hraniti s približno 250 mg ribje hrane v kosmičih (Tetra Min®, Tetra Phyll® ali druga podobna zaščitena znamka ribje hrane) na posodo na dan. Hrana se lahko daje v obliki suhega mletega prahu ali kot suspenzija v vodi: 1,0 g hrane v kosmičih se doda 20 ml vode za redčenje in zmeša, da nastane homogena mešanica. Ta pripravek se lahko daje v količini približno 5 ml na posodo na dan (pred uporabo ga je treba pretresti). Starejše ličinke lahko dobijo več hrane.

5. Hranjenje se prilagaja kakovosti vode. Če gojišče postane „moteno“, je treba hranjenje zmanjšati. Dodajanje hrane je treba skrbno spremljati. Premalo hrane bo povzročilo selitev ličink v vodni stolpec, preveč hrane pa povečano mikrobno dejavnost in zmanjšane koncentracije kisika. Oboje lahko privede do počasnejše rasti.

6. Ko se pripravijo nove posode za gojenje, se lahko dodajo tudi celice nekaterih zelenih alg (npr. *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*).

Hranjenje preobraženih odraslih osebkov

7. Nekateri raziskovalci so predlagali, da se lahko kot hrana za odrasle preobražene osebke uporabi vatna blazinica, namočena v nasičeno raztopino saharoze.

▼M6

Preobrazba

8. Pri 20 ± 2 °C se bo preobrazba v odrasle osebke iz posod za gojenje ličink začela po približno 13 do 15 dneh. Samce je mogoče preprosto razlikovati po pahljačastih tipalkah in suhem telesu.

Jajčna legla

9. Ko so v kletki za razmnoževanje odrasli osebki, je treba vse posode za gojenje ličink trikrat na teden preveriti glede morebitnih odloženih želatinastih jajčnih legel. Če so prisotna, jih je treba previdno odstraniti. Prenesti jih je treba v majhno posodo, ki vsebuje vzorec vode za razmnoževanje. Jajčna legla se uporabijo za pripravo nove posode za gojenje (npr. 2 do 4 jajčna legla/posodo) ali za preskuse strupenosti.

10. Ličinke prvega stadija bi se morale izvaliti po 2 ali 3 dneh.

Priprava novih posod za gojenje

11. Ko so gojišča vzpostavljena, bi moralo biti mogoče novo posodo za gojenje za ličinke pripraviti vsak teden ali manj pogosto, odvisno od zahtev preskušanja, stare posode pa odstraniti, ko se ličinke preobrazijo v odrasle osebke. S takim sistemom bo najpreprosteje zagotovljena redna oskrba z odraslimi osebki.

Končne koncentracije v preskusnih raztopinah „M4“ in „M7“

12. Elendt (1990) je opisal medij „M4“. Medij „M7“ se pripravi kot medij „M4“, razen za snovi, navedene v tabeli 1, za katere so koncentracije pri „M7“ štirikrat nižje kot pri „M4“. Preskusna raztopina se ne sme pripraviti po Elendt in Bias (1990), saj koncentracije $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 in K_2HPO_4, navedene za pripravo založnih raztopin, niso ustrezne.

Priprava medija „M7“

13. Vsaka založna raztopina (I) se pripravi posebej, sestavljena založna raztopina (II) pa se pripravi iz teh založnih raztopin (I) (glej tabelo 1). V 50 ml sestavljene založne raztopine (II), ki ji je dodana količina vsake založne raztopine makrohranilnih snovi, navedena v tabeli 2, se dolije deionizirana voda do 1 litra, da se pripravi medij „M7“. Založna raztopina vitaminov se pripravi tako, da se trije vitamini dodajo v deionizirano vodo, kot je navedeno v tabeli 3, 0,1 ml sestavljene založne raztopine vitaminov pa se doda končnemu mediju „M7“ malo pred uporabo. Založna raztopina vitaminov se hrani zamrznjena v majhnih alikvotih. Medij se prezračuje in stabilizira.

Tabela 1

Založne raztopine elementov v sledeh za medija M4 in M7

Založne raztopine (I)	Količina (mg) za pripravo 1 litra z deionizirano vodo	Za pripravo sestavljene založne raztopine (II): zmešajo se naslednje količine (ml) založnih raztopin (I) in dopolnijo do 1 litra z deionizirano vodo		Končne koncentracije v preskusnih raztopinah (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Založne raztopine (I)	Količina (mg) za pripravo 1 litra z deionizirano vodo	Za pripravo sestavljene založne raztopine (II): zmešajo se naslednje količine (ml) založnih raztopin (I) in dopolnijo do 1 litra z deionizirano vodo		Končne koncentracije v preskusnih raztopinah (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Te snovi se pri M4 in M7 razlikujejo, kot je navedeno zgoraj.
(2) Te raztopine se pripravijo posamezno, nato zlijejo skupaj in takoj avtoklavirajo.

Tabela 2

Založne raztopine makrohranilnih snovi za medija M4 in M7

	Količina za pripravo 1 litra z deionizirano vodo (mg)	Količina založnih raztopin makrohranilnih snovi za pripravo medijev M4 in M7 (ml/l)	Končne koncentracije v preskusnih raztopinah M4 in M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabela 3

Založna raztopina vitaminov za medija M4 in M7

Vse tri raztopine vitaminov so združene v eno.

	Količina za pripravo 1 litra z deionizirano vodo (mg)	Količina dodane založne raztopine vitaminov za pripravo medijev M4 in M7 (ml/l)	Končne koncentracije v preskusnih raztopinah M4 in M7 (mg/l)
Tiamin hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

VIRI

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, uredila M. Streloke in H. Köpp. Berlin.

Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25–33.

Elendt, B. P., in W.-R. Bias (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna,* Water Research, 24: 1157–1167.

▼M6

Dodatek 3

Priprava formulirane usedline

SESTAVA USEDLINE

Sestava formulirane usedline mora biti naslednja:

Sestavina	Značilnosti	Delež suhe teže usedline v %
šota	šotni mah, čim bližje pH 5,5–6,0, brez vidnih ostankov rastlin, fino mlet (velikost delcev ≤ 1 mm) in sušen na zraku	4–5
kremenov pesek	velikost zrn: > 50 % delcev mora biti velikih 50–200 μm	75–76
kaolinska glina	vsebnost kaolinita ≥ 30 %	20
organski ogljik	uravnava se z dodatkom šote in peska.	2 (± 0,5)
kalcijev karbonat	$CaCO_3$, zdrobljen v prah, kemijsko čist.	0,05–0,1
voda	prevodnost ≤ 10 μS/cm	30–50

PRIPRAVA

Šota se posuši na zraku in zmelje v fin prah. Pripravi se suspenzija potrebne količine šote v prahu v deionizirani vodi, za kar se uporabi visoko zmogljiva naprava za homogenizacijo. Vrednost pH te suspenzije se s $CaCO_3$ uravna na 5,5 ± 0,5. Suspenzija se vsaj dva dni kondicionira z rahlim mešanjem pri 20 ± 2 °C, da se stabilizira pH in vzpostavi stabilna mikrobna komponenta. Vrednost pH se znova izmeri in mora biti 6,0 ± 0,5. Šotna suspenzija se nato zmeša z drugimi sestavinami (peskom in kaolinsko glino) in deionizirano vodo, da nastane homogena usedlina z vsebnostjo vode v razponu 30 – 50 % suhe teže usedline. pH končne mešanice se znova izmeri in po potrebi uravna na 6,5 do 7,5 s $CaCO_3$. Odvzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in vsebnost organskega ogljika. Priporoča se, da se formulirana usedlina pred uporabo v preskusu strupenosti s trzačami sedem dni kondicionira v enakih pogojih, kot vladajo v poznejšem preskusu.

SHRANJEVANJE

Suhe sestavine za pripravo umetne usedline se lahko shranjujejo v suhem in hladnem prostoru pri sobni temperaturi. Formulirana (mokra) usedlina se pred uporabo v preskusu ne sme shranjevati. Uporabiti jo je treba takoj po 7-dnevnem obdobju kondicioniranja, s katerim se njena priprava konča.

VIRI

OECD (1984). *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., in B. Streit (1998). Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10–20.

▼**M6**

Dodatek 4

Kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje

SESTAVINA	KONCENTRACIJE
delci	< 20 mg/l
skupni organski ogljik	< 2 mg/l
neionizirani amoniak	< 1 µg/l
trdota kot $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
ostanek klora	< 10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l

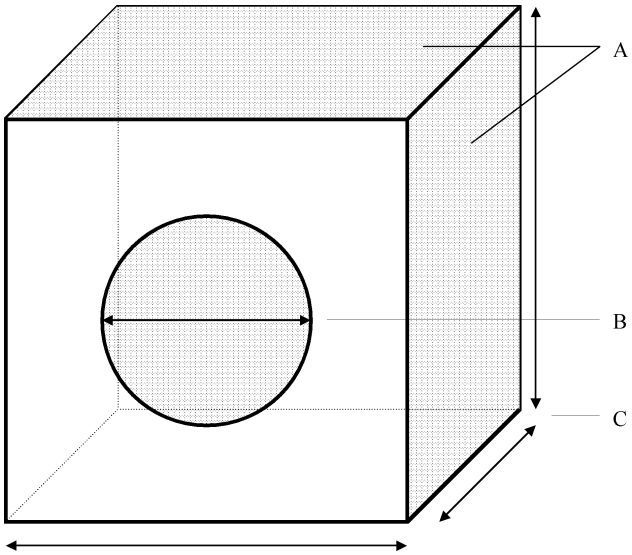
(*) Če se domneva, da bo prišlo do interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno kemikalijo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto (v takem primeru se torej ne sme uporabiti medij Elendt M4).

▼**M6**

Dodatek 5

Smernica za izvedbo preskusa

Primer kletke za razmnoževanje:



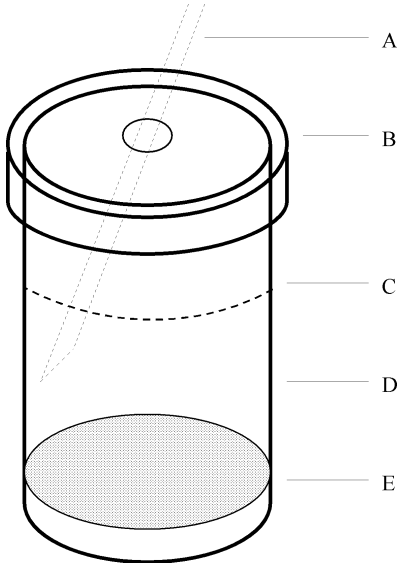
A: gaza na vrhu in vsaj eni stranici kletke (velikost mreže je približno 1 mm);

B: odprtina za vnos preobraženih odraslih osebkov v kletko za razmnoževanje in odstranjevanje odloženih nizov jajčec iz kristalizirk (na sliki niso prikazane);

C: kletka za razmnoževanje, dolga najmanj 30 cm, visoka najmanj 30 cm in široka najmanj 30 cm.

▼**M6**

Primer preskusne posode:



A: pasteurjeva pipeta za dovajanje zraka v vodo nad usedlino;

B: stekleni pokrov za preprečevanje pobega preobraženih trzač;

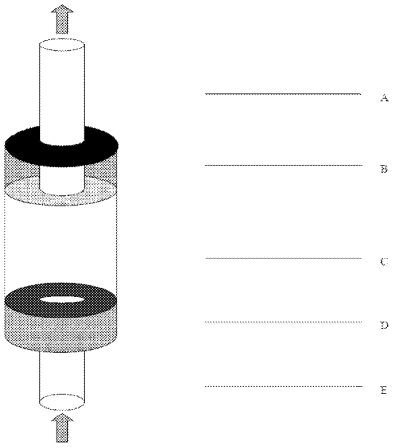
C: gladina vode;

D: preskusna posoda (steklena časa s prostornino najmanj 600 ml);

E: plast usedline.

▼**M6**

Primer sesalnika za zajetje odraslih trzač (puščici označujeta smer zračnega toka):



A: steklena cev (notranji premer približno 5 mm), priključena na samosesalno črpalko;

B: zamašek iz gume, preluknjan s stekleno cevjo (A). Znotraj je odprtina steklene cevi (A) prekrita z bombažem in gazo (velikost mreže je približno 1 mm), da se preprečijo poškodbe trzač, ko jih sesalnik posesa;

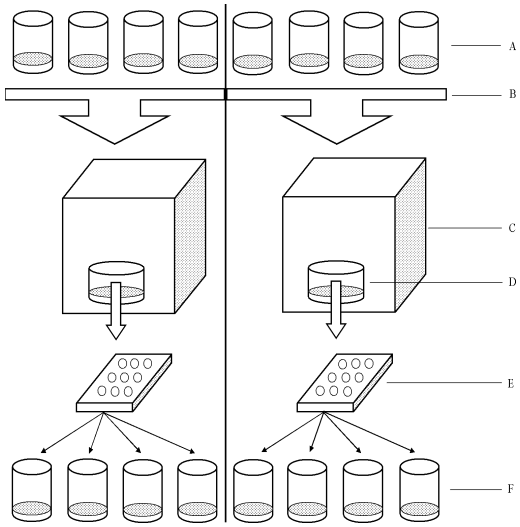
C: prozoren vsebnik (plastičen ali steklen, dolg približno 15 cm) za ujete trzače;

D: zamašek iz gume, preluknjan s cevjo (E). Zamašek D se odstrani z vsebnika C, da se trzače spustijo v kletko za razmnoževanje;

E: cev (plastična ali steklena, notranji premer približno 8 mm) za zbiranje odraslih trzač iz posode.

▼**M6**

Shematski prikaz preskusa življenjskega cikla:



A: prva generacija – preskusne posode, ki vsebujejo sistem z vodo in usedlino, osem ponovitev, 20 ličink prvega stadija na posodo;

B: štiri preskusne posode za vsako kletko za razmnoževanje, A in B;

C: kletki za razmnoževanje (A in B) za rojenje, parjenje in odlaganje jajčec;

D: kristalizirki za odlaganje nizov jajčec;

E: mikroplošči, ena vdolbinica za vsak niz jajčec;

F: druga generacija – preskusne posode, ki vsebujejo sistem z vodo in usedlino, osem ponovitev, 20 ličink prvega stadija na posodo.

▼M6

C.41 PRESKUS SPOLNEGA RAZVOJA RIB

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 234 (2011). Temelji na sklepu iz leta 1998, da se pripravijo nove ali posodobijo obstoječe preskusne metode za spremljanje in preskušanje potencialnih povzročiteljev endokrinih motenj. Preskus spolnega razvoja rib (FSDT) je bil opredeljen kot obetavna preskusna metoda, ki zajema občutljivo življenjsko fazo rib, ki se odzivajo na kemikalije, podobne estrogenu in androgenu. Med letoma 2006 in 2010 se je izvajala medlaboratorijska validacija preskusne metode, pri čemer so bile validirane japonska medaka (*Oryzias latipes*), cebrica (*Danio rerio*) in zet (*Gasterosteus aculeatus*), črnoglavi pisanec (*Pimephales promelas*) pa je bil delno validiran (41) (42) (43). Ta protokol vključuje japonsko medako, zeta in cebrico. Protokol je načeloma razširitev OECD TG 210 Ribe, preskus strupenosti v zgodnji življenjski fazi (1), kjer se izpostavljenost nadaljuje, dokler niso ribe spolno diferencirane, tj. približno 60 dni po tem, ko se izvalijo (DPH), pri japonski medaki, zetu in cebrici (obdobje izpostavljenosti je lahko pri drugih vrstah, ki še bodo validirane, krajše ali daljše), pri čemer se dodajo endokrine občutljive končne točke. S preskusom spolnega razvoja rib se ocenjujejo učinki v zgodnji življenjski fazi in možne škodljive posledice kemikalij, ki domnevno povzročajo endokrine motnje (npr. inhibitorji estrogenov, androgenov in steroidogeneze) spolnega razvoja. Kombinacija dveh glavnih endokrinih končnih točk, koncentracija vitelogenina (VTG) in fenotipsko razmerje med spoloma omogočajo, da se s preskusom nakaže način delovanja preskusne kemikalije. Zaradi spremembe fenotipskega razmerja med spoloma, ki je pomembna za populacijo, se lahko preskus spolnega razvoja rib uporablja za oceno nevarnosti in tveganja. Če se preskus uporabi za oceno nevarnosti ali tveganja, pa se zet ne sme uporabiti, ker validacijski podatki, ki so do zdaj na voljo, kažejo, da so pri tej vrsti spremembe fenotipskega razmerja med spoloma, ki jih povzroči preskusna kemikalija, neobičajne.

2. Protokol temelji na ribah, ki so kemikalijam izpostavljene prek vode v spolno nestabilnem obdobju, v katerem naj bi bile ribe najbolj občutljive na učinke kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje, ki ovirajo spolni razvoj. Glavni končni točki se izmerita kot kazalnika razvojnih kromosomskih aberacij, povezanih z endokrinim sistemom, koncentracije VTG in razmerja med spoloma (deleža po spolu), določena s histologijo spolnih žlez. Histopatologija spolnih žlez (ocena in določanje faze oocitov in spermatogenih celic) ni obvezna. Poleg tega se določi genetski spol, kadar koli je mogoče (npr. pri japonski medaki in zetu). Prisotnost označevalca genetskega spola je pomembna prednost, ker poveča moč statističnih podatkov o razmerju med spoloma in omogoči zaznavanje posamezne spremembe fenotipičnega spola. Druge zgornje končne točke, ki jih je treba izmeriti, vključujejo hitrost izvalitve, preživetje, dolžino in telesno težo. Preskusna metoda bi se lahko prilagodila drugim vrstam, ki niso omenjene zgoraj, če bi prestale enako validacijo, kot so jo japonska medaka, zet in cebrica, če so ribe iz kontrole ob koncu preskusa spolno diferencirane, če so ravni VTG dovolj visoke za zaznavanje pomembnih variacij, povezanih s kemikalijo, in če se z referenčnimi kemikalijami z endokrinim delovanjem ((anti-)estrogeni, (anti-)androgeni, inhibitorji aromataze itd.) vzpostavi občutljivost preskusnega sistema. Poleg tega mora OECD pregledati vsa validacijska poročila, ki se nanašajo na podatke o preskusu spolnega razvoja rib z uporabo drugih vrst, rezultat validacije pa se mora šteti za zadovoljivega.

▼M6

Začetni pomisleki in omejitve

3. VTG običajno proizvajajo jetra samic oviparnih vretenčarjev kot odziv na kroženje endogenega estrogena (2). Je predhodna sestavina beljakovin jajčnega rumenjaka, ki po nastanku v jetrih potuje po krvnem obtoku do jajčnika, kjer jo absorbirajo in spremenijo razvijajoča se jajčeca. Sinteza VTG je pri nezrelih ribah in odraslih samcih rib zelo omejena, ker nimajo dovolj krožečega estrogena, čeprav zaznavna. Vendar so jetra sposobna sinteze in izločanja VTG kot odziv na spodbujanje eksogenega estrogena (3) (4) (5).

4. Meritev VTG je namenjena zaznavanju kemikalij z estrogenimi, antiestrogenimi in androgenimi načini delovanja ter kemikalijam, ki vplivajo na steroidogenezo, kot so na primer inhibitorji aromataze. Zaznavanje estrogenih kemikalij je mogoča z meritvijo indukcije VTG pri samcih in je bila obsežno dokumentirana v strokovno pregledani znanstveni literaturi. Indukcija VTG je bila dokazana tudi po izpostavljenosti androgenom, ki se lahko aromatizirajo (6) (7). Zaradi zmanjšanja ravni kroženja estrogena pri samicah, na primer z zaviranjem aromataze, ki spremeni endogeni androgen v naravni estrogen 17β-estradiol, se zmanjša koncentracija VTG, ki se uporablja za zaznavanje kemikalij, ki imajo lastnosti zaviranja aromataze, ali širše inhibitorjev steroidogeneze (33). Biološka pomembnost odziva VTG na zaviranje estrogena/aromataze je bila dokazana in obsežno dokumentirana (8) (9). Vendar je mogoče, da lahko na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna strupenost in neendokrini strupeni načini delovanja.

5. Za redno uporabo za kvantifikacijo VTG v krvi, jetrih, celotnem telesu ali odvzetih vzorcih homogenata glave/repa posameznih rib je bilo uspešno razvitih in standardiziranih več merilnih metod. Tako je pri cebrici, zetu in japonski medaki ter tudi pri delno validirani vrsti črnoglavega pisanca; na voljo so metode encimskega imunskega testa (ELISA), ki so specifične za posamezne vrste in uporabljajo imunokemijo za kvantifikacijo VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Pri japonski medaki in cebrici je dobra povezava med VTG, izmerjenim v krvni plazmi, jetrih in vzorcih homogenata, čeprav bi lahko homogenati kazali nekoliko manjše vrednosti kot plazma (17) (18) (19). V Dodatku 5 so navedeni priporočeni postopki za odvzem vzorcev za analizo VTG.

6. Sprememba fenotipskega razmerja med spoloma (deleži po spolu) so končna točka, ki izraža spremembo spola. Načeloma lahko estrogeni, antiestrogeni, androgeni, antiandrogeni in kemikalije, ki zavirajo steroidogenezo, vplivajo na razmerje med spoloma pri ribah, ki se razvijajo (20). Dokazano je bilo, da je sprememba spola pri cebricah delno spremenljiva (21) po izpostavljenosti kemikaliji, ki je podobna estrogenu, pri čemer je sprememba spola po izpostavljenosti kemikaliji, ki je podobna androgenu, stalna (30). Spol se določi kot ženski, moški, dvospolni (v eni spolni žlezi so oociti in spermatogene celice) ali nediferenciran ter se pri posameznih ribah določi s histološkim pregledom spolnih žlez. Smernice so navedene v Dodatku 7 in Smernici OECD za določitev histopatologije, povezane z endokrinim sistemom, spolnih žlez pri ribah (22).

7. Genetski spol se pregleda prek genetskih označevalcev, kadar obstajajo pri dani vrsti rib. Pri japonski medaki se lahko ženski geni XX ali moški geni XY določijo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) ali z analizo na

▼M6

kromosom Y vezanega gena z domeno DM (prisotnost ali odsotnost domene DM), kot je opisano v (23) (24). Za zeta obstaja enakovredna metoda PCR za določitev genetskega spola, ki je opisana v Dodatku 10. Če se lahko posamezni genetski spol poveže s fenotipičnim spolom, se vrednost preskusa izboljša, pri čemer je zato treba genetski spol določiti pri vrstah z dokumentiranimi označevalci genetskega spola.

8. Glavni endokrini končni točki, tj. VTG in razmerje med spoloma, lahko skupaj dokažeta endokrini način delovanja (MOA) kemikalije (tabela 1). Razmerje med spoloma je biomarker, pomemben za populacijo (25) (26), za nekatere dobro opredeljene načine delovanja pa se lahko rezultati preskusa spolnega razvoja rib uporabijo za namene ocene nevarnosti in tveganja, če regulativna agencija meni, da je to ustrezno. Ti načini delovanja so zdaj estrogeni, androgeni in inhibitorji steroidogeneze.

Tabela 1

Odziv endokrinih končnih točk na različne načine delovanja kemikalij:

↑= povečevanje, ↓= zmanjševanje, – = se ne proučuje

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Razmerje med spoloma	Viri
šibek agonist estrogena	↑	↑	↑ ♀ ali ↑ nedif.	(27) (40)
močan agonist estrogena	↑	↑	↑ ♀ ali ↑ nedif., ne ♂	(28) (40)
antagonist estrogena	—	—	↓ ♀, ↑ nedif.	(29)
agonist androgena	↓ ali –	↓ ali –	↑ ♂, ne ♀	(28) (30)
antagonist androgena	—	—	↑ ♀ ↑ dvospolni	(31)
inhibitor aromataze	↓	↓	↓ ♀	(33)

9. Preskus spolnega razvoja rib ne zajema razmnoževalne življenjske faze rib, zato je treba kemikalije, ki domnevno vplivajo na razmnoževanje pri nižjih koncentracijah kot na spolni razvoj, proučiti s preskusom, ki zajema razmnoževanje.

10. Opredelitve pojmov za namen te preskusne metode so navedene v Dodatku 1.

11. Cilj preskusa spolnega razvoja rib *in vivo* je določitev kemikalij z androgenimi in estrogenimi lastnostmi ter antiandrogenimi lastnostmi, antiestrogenimi lastnostmi in lastnostmi, ki zavirajo steroidogenezo. Fazi validacije preskusa spolnega razvoja rib (1 in 2) sta zajeli estrogene in androgene kemikalije ter kemikalije, ki zavirajo steroidogenezo. Učinki na antagoniste estrogena in androgena v preskusu spolnega razvoja rib so navedeni v tabeli 1, vendar so ti načini delovanja zdaj manj dokumentirani.

NAČELO PRESKUSA

12. V preskusu so ribe od novo oplojene ikre do konca spolne diferenciacije izpostavljene vsaj trem koncentracijam preskusne kemikalije, raztopljene v vodi. Preskusni pogoji morajo biti pretočni, razen če niso mogoči zaradi razpoložljivosti ali narave (npr. omejena topnost) preskusne kemikalije. Preskus se začne z vnosom novo oplojenih iker (pred brazdanjem blastodiska) v preskusne komore. Vnos posameznih vrst v komore je opisan v

▼M6

odstavku 27. Pri validiranih vrstah, tj. japonski medaki, zetu in cebrici, se preskus konča 60 dni po izvalitvi. Po koncu preskusa se vse ribe humano evtanazirajo. Za analizo VTG se odvzamejo biološki vzorci (krvna plazma, jetra ali homogenat glave/repa) posameznih rib, preostali del pa se fiksira za histološko oceno spolnih žlez, da se določi fenotipični spol; neobvezno se lahko opravi histopatologija (npr. določanje faze spolnih žlez, stopnja dvospolnosti). Pri vrstah, ki imajo ustrezne označevalce, se odvzame biološki vzorec (predrepna ali hrbtna plavut) za določitev genetskega spola (dodatka 9 in 10).

13. Pregled zadevnih preskusnih pogojev, specifičnih za validirane vrste, tj. japonsko medako, zeta in cebrico, je naveden v Dodatku 2.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

14. Na voljo morajo biti rezultati preskusa akutne strupenosti ali drugega kratkoročnega preskusa strupenosti [npr. preskusna metoda C.14 (34) in OECD TG 210 (1)], po možnosti izvedenega z vrstami, izbranimi za ta preskus. To pomeni, da sta znana topnost preskusne kemikalije v vodi in parni tlak preskusne kemikalije ter da je na voljo zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo kemikalije v preskusnih komorah z znano in izpričano točnostjo ter mejo zaznavnosti.

15. Druge uporabne informacije so strukturna formula, čistost kemikalije, stabilnost v vodi ali na svetlobi, P_{ow} in rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (metoda C.4) (35).

Merila za sprejemljivost preskusa

16. Za sprejemljivost rezultatov preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti ves čas preskusa vsaj 60 % nasičenosti z zrakom (ASV),

— razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih komorah med obdobjem izpostavljenosti nikoli ne sme biti večja od ± 1,5 °C in jo je treba vzdrževati znotraj temperaturnih razponov, ki so določeni za preskusno vrsto (Dodatek 2),

— na voljo mora biti validirana metoda za analizo kemikalije za izpostavljenost z mejo zaznavnosti, ki je znatno nižja od najnižje nominalne koncentracije, zbrati pa je treba dokaze, da so bile koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo ohranjene v razponu ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti,

— število vseh preživelih oplojenih iker v kontrolah in, kadar je primerno, v kontrolah s topilom mora biti večje ali enako mejnim vrednostim iz Dodatka 2,

— merila sprejemljivosti, povezana z rastjo in lastnostmi spola ob koncu preskusa, temeljijo na podatkih iz kontrolnih skupin (združene kontrole s topilom in vodo, če pa se zelo razlikujejo, samo s topilom):

▼M6

		Japonska medaka	Cebrica	Zet
Rast	Mokra teža ribe (osušene s pivnikom)	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Dolžina (standardna dolžina)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Razmerje med spoloma (% samcev ali samic)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Če se uporabi topilo, ne sme imeti statistično značilnega učinka na preživetje in ne sme povzročati učinkov endokrinih motilcev ali drugih škodljivih učinkov na zgodnje življenjske faze, kar se pokaže s kontrolo s topilom.

Če se opazi odstopanje od meril za sprejemljivost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost podatkov o preskusu in te pomisleke vključiti v poročanje.

OPIS PRESKUSNE METODE

Preskusne komore

17. Uporabijo se lahko kakršne koli steklene, nerjavne ali druge kemijsko inertne komore. Komore morajo biti dovolj velike, da omogočajo skladnost s stopnjo obremenitve, navedeno v nadaljevanju. Priporočljivo je, da se preskusno komore naključno postavijo v preskusno območje. Bolj kot povsem naključni načrt se priporoča načrt naključne razdelitve v bloke, pri kateri so v vsakem bloku prisotne vse koncentracije. Preskusne komore morajo biti zaščitene pred neželenimi motnjami.

Izbira vrst

18. Priporočene vrste rib so navedene v Dodatku 2. Postopki za vključitev novih vrst so navedeni v odstavku 2.

Vzdrževanje starševskih rib

19. Podrobnosti o vzdrževanju starševskih rib v zadovoljivih pogojih so navedene v OECD TG 210 (1). Starševske ribe je treba enkrat ali dvakrat na dan hraniti z ustrezno hrano.

Ravnanje z embrii in ličinkami

20. Embrii in ličinke se lahko na začetku izpostavijo v glavni komori v manjših steklenih ali nerjavnih komorah, ki imajo mrežaste stranice ali konce, da se lahko skozi komoro pretaka preskusna kemikalija. Neturbulentni tok skozi te majhne komore se lahko doseže tako, da se komore obesijo na držalo, nameščeno tako, da premika posodo gor in dol, vendar tako, da so organizmi ves čas potopljeni.

21. Kadar se za zadrževanje iker v glavni preskusni komori uporabljajo posodice, rešetke ali mreže za ikre, je treba te priprave odstraniti, ko se ličinke izvalijo, obdržijo se le mreže, da ribe ne pobegnejo. Če je treba ličinke prenesti, se te ne smejo izpostaviti zraku in pri spuščanju rib iz posod za ikre se ne smejo uporabljati lovilne mrežice. Čas prenosa je različen, odvisno od vrste, in tudi ni vselej potreben.

▼M6

Voda

22. Vsaka voda, v kateri je preživetje preskusne vrste v kontroli vsaj tako dobro kot v vodi, opisani v Dodatku 3, je primerna kot preskusna voda. Voda mora biti ves čas trajanja preskusa konstantne kakovosti. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer z odzivom na preskusno kemikalijo) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmikih odvzemati vzorce za analizo. Skupni organski ogljik, prevodnost, pH in suspendirane trdne snovi je treba izmeriti na primer vsake tri mesece, če je znano, da je kakovost vode za redčenje razmeroma konstantna. Če je kakovost vode vprašljiva, je treba izvajati meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) ter pesticidov. Podrobnosti o kemijski analizi in odvzemu vode so navedene v odstavku 34.

Preskusne raztopine

23. Če je izvedljivo, je treba uporabiti pretočni sistem. Za pretočne preskuse je potreben sistem, ki stalno odmerja in redči založno raztopino preskusne kemikalije (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik in sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok založnih raztopin in vode za redčenje je treba med preskusom preverjati v časovnih razmikih in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Ugotovljeno je bilo, da je primeren pretok enak prostornini vsaj petih preskusnih komor na 24 ur (1). Izogibati se je treba uporabi cevnega materiala ali drugih materialov, ki lahko vsebujejo biološko aktivne kemikalije ali adsorbirajo preskusno kemikalijo.

24. Založno raztopino je treba po možnosti pripraviti brez uporabe topil preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem ali ultrazvočnim razbijanjem). Če se preskusna kemikalija v vodi težko raztopi, je treba upoštevati postopke, opisane v Smernici OECD za preskušanje strupenosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (36). Uporabi topil se je treba izogniti, vendar bo v nekaterih primerih morda potrebna, da se pripravi primerno koncentrirana založna raztopina. Primeri ustreznih topil so navedeni v (36).

25. Polstatičnim preskusnim pogojem se je treba izogibati, razen če so utemeljeni s trdnimi razlogi, povezanimi s preskusno kemikalijo (npr. stabilnost, omejena razpoložljivost, visoki stroški ali nevarnost). Za polstatično tehniko se lahko uporabita dva različna postopka obnove; bodisi se pripravijo nove preskusne raztopine v čistih posodah ter se preživele ikre in ličinke nežno prenesejo v nove posode bodisi preskusni organizmi ostanejo v preskusnih komorah, medtem ko se vsak dan zamenja del (vsaj dve tretjini) preskusne vode.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Odvzem iker in trajanje

26. Da bi preprečili genetsko nagnjenost, se ikre odvzamejo pri vsaj treh parih ali skupinah, ki se parijo, premešajo in naključno izberejo za začetek preskusa. Opis umetne oploditve pri zetu je opisan v Dodatku 11. Preskus se mora začeti čim prej po tem, ko se ikre oplodijo, pri čemer se embrii po

▼M6

možnosti potopijo v preskusne raztopine pred začetkom brazdanja blastodiska ali čim prej po tej fazi in ne pozneje kot 12 ur po oploditvi. Preskus se mora izvajati do konca spolne diferenciacije v kontrolni skupini (pri japonski medaki, zetu in cebrici 60 dni po tem, ko se izležejo).

Obremenitev

27. Na začetku preskusa mora biti na eno koncentracijo vsaj 120 oplojenih iker, razdeljenih med vsaj 4 ponovitve (sprejemljiva je razporeditev v kontrole na podlagi kvadratnega korena). Ikre je treba naključno porazdeliti (z uporabo statističnih tabel za naključno razporeditev) med tretiranja. Stopnja obremenitve (za opredelitev glej Dodatek 1) mora biti dovolj nizka za vzdrževanje koncentracije raztopljenega kisika na vsaj 60 % nasičenosti z zrakom brez neposrednega prezračevanja komor. Za pretočne preskuse je priporočena stopnja obremenitve, ki nikoli ne presega 0,5 g/l na 24 ur in ne presega 5 g/l raztopine. Najpozneje 28 dni po oploditvi je treba število rib na ponovitev prerazporediti, da je v vsaki ponovitvi čim bolj enako število rib. Če se pojavi smrtnost, povezana z izpostavljenostjo, je treba število ponovitev ustrezno zmanjšati, da se ohrani čim bolj enaka gostota rib med stopnjami tretiranja.

Svetloba in temperatura

28. Obdobje osvetljenosti in temperatura vode morata biti ustrezna za preskusno vrsto (za poskuse pogoje za preskus spolnega razvoja rib glej Dodatek 2).

Hranjenje

29. Hrana in hranjenje sta ključna, zato je bistveno, da se pravilna hrana za posamezno fazo dovaja v ustreznih časovnih razmikih in v količini, ki je ustrezna za podporo normalne rasti. Hranjenje mora biti *ad libitum*, pri čemer je treba čim bolj zmanjšati presežek. Za zagotovitev ustrezne hitrosti rasti je treba ribe hraniti vsaj dvakrat na dan (ob vikendih je sprejemljivo enkrat na dan), med posameznimi krmljenji pa morajo preteči vsaj tri ure. Ostanke hrane in iztrebke je treba odstraniti, da se prepreči kopičenje odpadkov. S pridobljenimi izkušnjami se hrana in načini hranjenja stalno izpopolnjujejo, da se izboljšata preživetje in rast. Zato si je treba prizadevati za potrditev predlaganega načina pri priznanih strokovnjakih. Hranjenje je treba prekiniti 24 ur pred koncem preskusa. Primeri ustrezne hrane so navedeni v Dodatku 2 (glej tudi okvir OECD za preskušanje rib (39)).

Preskusne koncentracije

30. Preskusne kemikalije morajo biti razporejene, kot je opisano v Dodatku 4. Uporabiti je treba vsaj tri preskusne koncentracije v vsaj štirih ponovitvah. Pri izbiri obsega preskusnih koncentracij je treba upoštevati krivuljo odvisnosti LC_{50} od časa izpostavljenosti pri akutnih študijah. Če se bodo podatki uporabiti za oceno tveganja, se priporoča pet preskusnih koncentracij.

31. Koncentracij kemikalije, ki so višje od 10 % LC_{50} pri akutnem odraslem osebku ali 10 mg/l, katera koli je nižja, ni treba preskusiti. Najvišja preskusna koncentracija mora biti 10 % LC_{50} v življenjski fazi ličinke/mladiča.

▼M6

Kontrole

32. Poleg preskusnih koncentracij je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje (≥ 4 ponovitve) in, če je ustrezno, kontrolo s topilom (≥ 4 ponovitve). V preskusu se lahko uporabijo le topila, za katera je bilo dokazano, da nimajo statistično značilnega učinka na končne točke preskusa.

33. Če se uporabi topilo, njegova končna koncentracija ne sme biti večja od 0,1 ml/l (36) in mora biti enaka v vseh preskusnih komorah, razen v kontroli z vodo za redčenje. Vendar si je treba čim bolj prizadevati, da se taka topila ne uporabijo ali da so koncentracije topil čim nižje.

Pogostost analitskih določitev in meritev

34. Kemijsko analizo koncentracije preskusne kemikalije je treba izvesti pred začetkom preskusa, da se preveri skladnost z merili sprejemljivosti. Vse ponovitve je treba ločeno analizirati na začetku in koncu preskusa. Med preskusom je treba vsaj enkrat na teden analizirati eno ponovitev na preskusno koncentracijo, pri čemer se ponovitve sistematično zamenjujejo (1, 2, 3, 4, 1, 2 …). Če se vzorci shranijo za poznejšo analizo, je treba metodo shranjevanja vzorcev predhodno validirati. Vzorce je treba filtrirati (npr. skozi 0,45 μm velike pore) ali centrifugirati, da se zagotovijo določitve kemikalij v dejanski raztopini.

35. Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, pH, skupno trdoto, prevodnost, slanost (če je ustrezno) in temperaturo v vseh preskusnih komorah. Raztopljeni kisik, slanost (če je ustrezno) in temperaturo je treba meriti vsaj enkrat na teden, pH, prevodnost in trdoto pa na začetku in koncu preskusa. Temperaturo je treba po možnosti stalno spremljati v vsaj eni preskusni komori.

36. Rezultati morajo temeljiti na merjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali merjenih vrednostih.

Opažanja in meritve

Faze razvoja embria

37. Izpostavljenost se mora začeti čim prej po oploditvi in pred začetkom brazdanja blastodiska, vendar ne pozneje kot 12 ur po oploditvi, da se zagotovi izpostavljenost med zgodnjo fazo embrionalnega razvoja.

Izvalitev in preživetje

38. Vsaj enkrat na dan je treba opazovati izvalitev in preživetje ter to zapisati. Mrtve zarodke, ličinke in mladiče je treba odstraniti čim prej po tem, ko se opazijo, ker se lahko hitro razkrojijo in razpadejo zaradi delovanja drugih rib. Izjemna pazljivost je potrebna pri odstranjevanju posameznih mrtvih osebkov, da ne udarimo ali fizično poškodujemo sosednjih iker/ličink, saj so te izjemno nežne in občutljive. Merila za smrt so različna glede na življenjsko fazo:

— za ikre: zlasti v zgodnjih fazah opazna izguba prosojnosti in sprememba barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz,

▼M6

— za ličinke in mladiče: negibnost in/ali odsotnost dihalnega gibanja in/ali odsotnost srčnega utripa in/ali bela motna obarvanost osrednjega živčnega sistema in/ali pomanjkanje odzivanja na mehanske dražljaje.

Nenormalen videz

39. Zabeležiti je treba število ličink ali rib, pri katerih se kaže nenormalna oblika telesa, pri čemer je treba opisati videz in naravo nenormalnosti. Opozoriti je treba, da so nenormalni embrii in ličinke lahko naraven pojav, in jih je v kontrolah pri nekaterih vrstah lahko več odstotkov. Nenormalne živali je treba odstraniti iz preskusnih komor, ko poginejo. Vendar je treba v skladu z Direktivo 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene, živali anestezirati in evtanazirati v skladu z opisom iz odstavka 44 ter jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtne primere, če nenormalnosti povzročajo bolečino, trpljenje in stisko ali je mogoče zanesljivo predvideti trajne poškodbe in pogin.

Nenormalno obnašanje

40. Nenormalnosti, npr. hiperventilacijo, nekoordinirano plavanje, netipično mirovanje in netipično obnašanje pri hranjenju, je treba zapisati, ko je pojavijo.

Teža

41. Na koncu preskusa je treba vse preživele ribe evtanazirati (anestezirati, če je treba vzeti vzorce krvi) ter izmeriti mokro težo (osušeno s pivnikom) posameznih osebkov.

Dolžina

42. Na koncu preskusa je treba izmeriti dolžine (standardna dolžina) posameznih osebkov.

43. Na podlagi teh opažanj bodo za poročanje na voljo vsi ali nekateri podatki, navedeni v nadaljevanju:

— skupna smrtnost,

— število zdravih rib na koncu preskusa,

— čas začetka in konca izvalitve,

— dolžina in teža preživelih živali,

— število deformiranih živali,

— število rib, ki kažejo nenormalno obnašanje.

Vzorčenje rib

44. Ribe se vzorčijo ob zaključku preskusa. Vzorčene ribe je treba evtanazirati npr. z MS-222 (100–500 mg/l, pufran z 200 mg $NaHCO_3$/l) ali FA-100 (4-alil-2-metoksifenol: evgenol) ter jih ločeno izmeriti in stehtati kot mokro težo (osušeno s pivnikom) ali anestezirati, če je treba vzeti vzorec krvi (glej odstavek 49).

Vzorčenje za analizo VTG in določitev spola s histološko oceno

45. Vse ribe je treba vzorčiti in pripraviti za analizo spola in VTG. Vse ribe je treba histološko analizirati, da se določi spol. Za meritve VTG je sprejemljivo

▼M6

podvzorčenje vsaj 16 rib iz vsake ponovitve. Za VTG je treba analizirati več rib, če se izkaže, da rezultati podvzorčenja niso jasni.

46. Postopek vzorčenja za VTG in določitev spola je odvisen od metode analize VTG.

Metoda homogenata glave/repa za analizo VTG

47. Riba se evtanazira. Glava in rep vsake ribe se ločita od njenega telesa z rezi s skalpelom neposredno za prsnimi plavutmi in neposredno za hrbtno plavutjo (glej sliko 1). Glave in repi rib se združijo, stehtajo ter ločeno oštevilčijo, zamrznejo v tekočem dušiku in shranijo pri – 70 °C ali manj za analizo VTG. Telo ribe se oštevilči in fiksira v ustreznem fiksativu za histološko oceno (22). Z uporabo te metode se VTG in histopatologija ocenita pri vsakem posameznem osebku, zato se lahko morebitna sprememba ravni VTG poveže s fenotipičnim spolom ribe ali genetskim spolom (japonska medaka in zet) ribe. Dodatne informacije so navedene v smernici za homogenizacijo (Dodatek 5) in smernici za kvantifikacijo VTG (Dodatek 6).

Metoda živega homogenata za analizo VTG

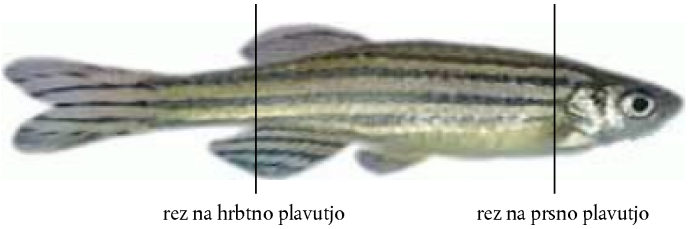
48. Riba se evtanazira. Jetra se secirajo in shranijo pri – 70 °C ali nižji temperaturi. Priporočeni postopki za odstranitev jeter in predhodno tretiranje so navedeni v OECD TG 229 (37) ali v poglavju C.37 te priloge (38). Jetra se nato ločeno homogenizirajo, kot je opisano v OECD TG 229 ali poglavju C.37 te priloge. Zbrani supernatant se uporabi za merjenje VTG s homogeno tehniko ELISA (glej Dodatek 6 za primer kvantifikacije pri cebrici ali OECD TG 229 (37) pri japonski medaki). Na podlagi tega pristopa se lahko pridobijo tudi podatki o VTG in histologiji spolnih žlez pri posameznih ribah.

Metoda krvne plazme za analizo VTG

49. Za pridobitev plazme se kri odvzame iz anestezirane ribe s srčno punkcijo, iz repne vede ali z rezom repa in centrifugira pri 4 °C. Plazma se do uporabe hrani pri – 70 °C ali nižji temperaturi. Za histologijo se cela riba evtanazira in fiksira. Vzorci plazme in ribe se ločeno oštevilčijo, da se ravni VTG povežejo s spolom ribe.

Slika 1

Rezanje ribe za meritev VTG v homogenatu glava/rep in histološko oceno srednje rezine



▼M6

Določitev genetskega spola

50. Pri vrstah, ki imajo ustrezne označevalce, se za določitev genetskega spola odvzame biološki vzorec posamezne ribe. Pri japonski medaki se odvzame iz predrepne ali hrbtne plavuti. Podroben opis, vključno z vzorčenjem tkiva in določanjem spola z metodo PCR, je naveden v Dodatku 9. Enako je za zeta opis vzorčenja tkiva in metode PCR za določanje spola naveden v Dodatku 10.

Meritev VTG

51. Meritev VTG mora temeljiti na kvantitativno in analitsko validirani metodi. Na voljo morajo biti informacije o variabilnosti metode pri preskusu in med preskusi, uporabljene v zadevnem laboratoriju. Vir laboratorijske in medlaboratorijske variabilnosti (najverjetneje) temelji na različnih razvojnih fazah populacije rib. Glede na variabilnost meritev VTG je treba NOEC, ki temeljijo le na tej končni točki, obravnavati zelo previdno. Na voljo so različne metode za oceno nastajanja VTG pri vrstah rib, obravnavanih v tem preskusu. Merilna tehnika, ki je razmeroma občutljiva in specifična, je določitev koncentracij proteinov z encimskim imunskim testom (ELISA). Uporabiti je treba homologna protitelesa (proti VTG iste vrste) in najpomembnejše homologne raztopine.

Določanje spola

52. Glede na postopek vzorčenja VTG se cela riba ali preostali srednji del vsake ribe vstavi v predhodno označeno kaseto za obdelavo in fiksira v ustreznem fiksativu za histološko določitev spola (neobvezno tudi za oceno določanja faze spolnih žlez). Smernice za fiksiranje in vstavljanje so navedene v Dodatku 7 in Smernici OECD za določitev histopatologije, povezane z endokrinim sistemom, spolnih žlez pri ribah (22). Ribe se po obdelavi vstavijo v parafinske bloke. Osebki se v parafinski blok vstavijo vzdolžno. Pri vsakem osebku se odvzame vsaj šest vzdolžnih rezin (debeline 3–5 μm) s sprednje ravnine, vključno s spolnim tkivom obeh spolnih žlez. Razmik med temi rezinami mora biti približno 50 μm pri samcih in 250 μm pri samicah. Ker pa vsak blok pogosto vsebuje samce in samice (če je v vsak blok vstavljen več kot en osebek), mora biti razmik med rezinami iz teh blokov približno 50 μm, dokler se ne pridobi vsaj šest rezin spolnih žlez od vsakega samca. Zato se lahko razmik med rezinami poveča na približno 250 μm pri samicah. Rezine se pobarvajo s hematoksilinom in eozinom ter pregledajo pod svetlobnim mikroskopom, pri čemer se osredotoči na spol (samec, samica, dvospolnik ali nediferencirani osebek). Dvospolnost je opredeljena kot prisotnost več kot enega oocita v testisu na šest analiziranih rezin ali spermatogenih celic (da/ne) v jajčnikih. Histopatologija ter določanje faze jajčnikov in testisov nista obvezna, če pa se izvedeta, je treba rezultate sistematično analizirati in o njih poročati. Opozoriti je treba, da je za nekatere vrste rib običajna nepopolna razvitost para spolnih žlez, pri čemer je lahko prisotna le ena spolna žleza (npr. japonska medaka in občasno cebrica). Vsa taka opažanja je treba zabeležiti.

53. Določitev genetskega spola pri posameznih osebkih japonske medake temelji na prisotnosti ali odsotnosti gena za določitev moškega spola, DMY, ki se nahaja na kromosomu Y. Genotipski spol medake se lahko

▼M6

določi s sekvenciranjem gena DMY iz DNA, ekstrahirane na primer iz kosa predrepne ali hrbtne plavuti. Prisotnost DMY kaže posameznika (samca) z geni XY ne glede na fenotip, medtem ko odsotnost DMY kaže posameznika (samico) z geni XX ne glede na fenotip (23). Smernice za pripravo tkiva in metodo PCR so navedene v Dodatku 9. Genetski spol se pri posameznih zetih določa tudi z metodo PCR, ki je opisana v Dodatku 10.

54. O pojavu dvospolnosti (za opredelitev glej Dodatek 1) je treba poročati.

Sekundarne spolne značilnosti

55. Sekundarne spolne značilnosti so pri vrstah, kot je japonska medaka, endokrino nadzorovane, zato je treba po možnosti opazovanje fizičnega videza rib izvesti na koncu izpostavljenosti. Pri japonski medaki je oblikovanje papil na zadnjem delu predrepne plavuti pri samicah občutljivo na androgen. V poglavju C.37 te priloge (38) so zadevne fotografije sekundarnih spolnih značilnosti pri samcih in androgeniziranih samic.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

56. Pomembno je, da se končna točka določi z najmočnejšim statističnim preskusom. Dvojnik je poskusna enota, vendar je treba v statistično preskušanje vključiti variabilnost v ponovitvah. V Dodatku 8 je na voljo diagram poteka za odločitev o uporabi najprimernejšega statističnega preskusa na podlagi značilnosti podatkov, pridobljenih s preskusom. Raven statistične značilnosti za vse vključene končne točke je 0,05.

Deleži spola in genetskega spola

57. Če obstaja monotoni odziv na odmerek, je treba deleže spola za znatne učinke (pristop NOEC/LOEC) izpostavljenosti analizirati s preskusom po Jonckheere-Terpstraju (preskus trenda). Če je ugotovljena nemonotonost, je treba uporabiti preskus med pari: Dunnettov preskus se uporabi, če se lahko pridobita normalnost in homogenost varianc. Tamhane-Dunnetov preskus se uporabi, če je prisotna homogenost varianc. Sicer se uporabi Mann-Whitneyjev preskus z Bonferroni-Holmovo prilagoditvijo. V Dodatku 8 je diagram poteka, v kateri so navedeni statistični podatki o deležih spola. Deleže spola je treba v tabelah predstaviti kot koncentracijski delež ± standardni odklon samcev, samic, dvospolnikov in nediferenciranih osebkov. Statistično značilnost je treba poudariti. Primeri so navedeni v validacijskem poročilu faze 2 preskusa spolnega razvoja rib (42). Genetski spol je treba sporočiti kot delež sprememb fenotipičnega spola samic, samcev, dvospolnikov in nediferenciranih osebkov.

Koncentracije VTG

58. Analizirati je treba pomemben učinek (pristop NOEC/LOEC) izpostavljenosti koncentracijam VTG. Bolj zaželen kot t-preskus z Bonferronijevim popravkom je Dunnettov preskus. Če se uporabi Bonferronijev popravek, je bolj zaželen Bonferroni-Holmov popravek. Dovoliti je treba logaritmično transformacijo VTG, da se dosežeta normalnost in homogenost varianc. Če je odziv na koncentracijo skladen z monotonostjo, ima preskus po Jonckheere-Terpstraju prednost pred vsemi navedenimi preskusi. Če se

▼M6

uporabi t-preskus ali Dunnettov preskus, za nadaljevanje ni potreben F-preskus pomembnosti analize variance. Podrobnosti so navedene v tabeli poteka v Dodatku 8. Rezultate je treba predstaviti v tabelah kot koncentracijske sredine ± standardni odklon samcev, samic, dvospolnikov in nediferenciranih osebkov. Poudariti je treba statistično značilnost za fenotipične samice in fenotipične samce. Primeri so navedeni v validacijskem poročilu faze 2 preskusa spolnega razvoja rib (42).

Dejanske koncentracije preskusne kemikalije

59. Dejanske koncentracije preskusne kemikalije v komorah je treba analizirati tako pogosto, kot je opisano v odstavku 34. Rezultate je treba sporočiti v tabelah kot srednjo koncentracijo ± standardni odklon na podlagi ponovitev in na podlagi koncentracij skupaj s poudarjenimi informacijami o številu vzorcev in izjemami pri srednji koncentraciji za tretiranje ± 20 %. Primeri so navedeni v validacijskem poročilu faze 2 preskusa spolnega razvoja rib (42).

Razlaga rezultatov

60. Rezultate preskusa je treba razlagati previdno, kadar so merjene koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih raztopinah blizu meje zaznavnosti analitske metode.

Poročilo o preskusu

61. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

— zadevne fizikalno-kemijske lastnosti, identifikacijski podatki kemikalije vključno s čistostjo in analitsko metodo za kvantifikacijo preskusne kemikalije.

Preskusni pogoji

— Uporabljeni postopek (npr. pretočni semi-statični/obnavljajoči; načrt preskusa, vključno s preskusnimi koncentracijami, metodo priprave založnih raztopin (v prilogi), pogostostjo obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če se uporabi),

— nominalne preskusne koncentracije, srednje vrednosti izmerjenih vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih komorah in metoda, s katero so bile te dobljene (uporabljeno analitsko metodo je treba predstaviti v prilogi), ter dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v pravi raztopini,

— kakovost vode v preskusnih komorah, pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika,

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost dajanja ter analiza onesnaževal (npr. PCB, PAH in organoklorni pesticidi), če je ustrezno.

Rezultati

— Dokazi, da so kontrole izpolnjevale merila za veljavnost: podatke o hitrosti izvalitve je treba predstaviti v tabelah kot delež na ponovitev in na koncentracijo. Poudariti je treba izjeme pri merilih sprejemljivosti (v kontrolah). Preživetje je treba predstaviti kot delež na ponovitev in na koncentracijo. Poudariti je treba izjeme pri merilih za veljavnost (v kontrolah),

— jasna navedba rezultatov, pridobljenih na različnih opazovanih končnih točkah: preživetje embriov in uspešna izvalitev; zunanje nenormalnosti,

▼M6

dolžina in teža; meritve VTG (ng/g homogenata, ng/ml plazme ali ng/mg jeter); histologija spolnih žlez, razmerje med spoloma, podatki o genetskem spolu, pojav katerih koli nenavadnih odzivov rib in vidnih učinkov zaradi preskusne kemikalije.

62. Rezultate preskusa je treba predstaviti kot srednje vrednosti ± standardni odklon (SD) ali standardno napako (SE). Statistične podatke je treba sporočiti vsaj kot NOEC in LOEC ter intervale zaupanja. Upoštevati je treba statistično tabelo poteka (Dodatek 8).

LITERATURA

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz.

(2) Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P., in Sumpter, J. P. (1996). „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals“, Environmental Toxicology and Chemistry 15, str. 194–202.

(3) Sumpter, J. P., in Jobling, S. (1995). „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment“, Environmental Health Perspectives 103, str. 173– 178.

(4) Tyler, C. R., van Aerle, R., Hutchinson, T. H., Maddix, S. in Trip, H. (1999). „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin“, Environmental Toxicology and Chemistry 18, str. 337–347.

(5) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L. in Bjerregaard, P. (2001a). „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, str. 119– 131.

(6) Andersen, L., Bjerregaard, P., in B. Korsgaard (2003). „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters“, Fish Physiology and Biochemistry 28, str. 319–321.

(7) Orn, S., Holbech, H., Madsen, T. H., Norrgren, L., in Petersen, G. I. (2003). „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone“, Aquatic Toxicology 65, str. 397–411.

(8) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Lange, R., Lye, C. M., Sumpter, J. P., Zerulla, M., in Tyler, C. R. (2002). „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances“, Environmental Toxicology and Chemistry 21, str. 319–326.

(9) Sun, L. W., Zha, J. M., Spear, P. A., in Wang, Z. J. (2007). „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, str. 533–541.

(10) Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A., in Sullivan, C. V. (1999). „Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, str. 113– 125.

(11) Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A., in Porcher, J. M. (2002). „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)“, Environmental Toxicology and Chemistry 21, str. 1699– 1708.

(12) Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R., in Tamiya, E. (2002). „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, str. 161– 169.

(13) Hahlbeck, E., Katsiadaki, I., Mayer, I., Adolfsson-Erici, M., James, J., in Bengtsson, B. E. (2004). „The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction“, Aquatic Toxicology 70, str. 311–326.

(14) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M.. in Iguchi, T. (2004). „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka“, Journal of Health Science 50, str. 301–308.

(15) Eidem, J. K., Kleivdal, H., Kroll, K., Denslow, N., van Aerle, R., Tyler, C., Panter, G., Hutchinson, T., in Goksoyr, A. (2006). „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology“, 78, str. 202–206.

(16) Jensen, K. M., in Ankley, G. T. (2006). „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)“, Ecotoxicology and Environmental Safety 64, str. 101– 105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., in Bjerregaard, P. (2001b). „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“, Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, str. 48–51.

(18) Nilsen, B. M., Berg, K., Eidem, J. K., Kristiansen, S. I., Brion, F., Porcher, J. M. in Goksoyr, A. (2004). „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening“, Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, str. 621–633.

(19) Orn, S., Yamani, S. in Norrgren, L. (2006). „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone“, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, str. 237–243.

(20) Scholz, S., in Kluver, N. (2009). „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development“ 3, str. 136–151.

(21) Fenske, M., Maack, G., Schafers, C. in Segner, H. (2005). „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio“, Environmental Toxicology and Chemistry 24, str. 1088– 1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Pariz.

(23) Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N., in Nagahama, Y. (2004). „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes“, Developmental Dynamics 231, str. 518–526.

(24) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S., in Sakaizumi M. (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations“, Zoological Science 21, str. 613–619.

(25) Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., in Flick, R. W. (2007). „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen“, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, str. 8897–8901.

(26) Palace,V. P., Evans, R. E., Wautier, K. G., Mills, K. H., Blanchfield, P. J., Park, B. J., Baron, C. L., in Kidd, K. A. (2009). „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake“, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, str. 1920– 1935.

(27) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Hurd, K. S., Bamforth, J., Stanley, R. D., Duffell, S., Hargreaves, A., Gimeno, S., in Tyler, C. R. (2006). „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)“, Aquatic Toxicology 77, str. 279–290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., Kinnberg, K., Petersen, G. I., Jackson, P., Hylland, K., Norrgren, L., in Bjerregaard, P. (2006). „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, str. 57–66.

(29) Andersen, L., Kinnberg, K., Holbech, H., Korsgaard, B., in Bjerregaard, P. (2004). „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)“, Fish Physiology and Biochemistry 30, str. 257–266.

(30) Morthorst, J. E., Holbech, H., in Bjerregaard, P. (2010). „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations“, Aquatic Toxicology 98, str. 336–343.

(31) Kiparissis,Y., Metcalfe, T. L., Balch, G. C. in Metcalf, C. D. (2003). „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)“, Aquatic Toxicology 63, str. 391–403.

(32) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Hurd, K. S., Sherren, A., Stanley, R. D., in Tyler, C. R. (2004). „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development“, Aquatic Toxicology 70, str. 11–21.

(33) Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G. I., in Bjerregaard, P. (2007). „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, str. 165– 170.

(34) Poglavje C.14 te priloge, Preskus rasti ribjih mladic.

(35) Poglavje C.4 te priloge, Razgradnja – biokemijska potreba po kisiku.

(36) OECD (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Pariz.

(37) OECD (2009). *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariz.

(38) Poglavje C.37 te priloge, 21-dnevni preskus rib: kratkotrajno presejalno preskušanje estrogenega in androgenega delovanja ter zaviranja aromataze.

(39) OECD (2012). Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Pariz.

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. (2007). „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio“, Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9– 10 str. 768–779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Pariz.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Pariz.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Pariz.

(44) Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o varstvu živali, ki se uporabljajo za znanstvene namene. UL L 276, 20.10.2010, str. 33.

▼M6

Dodatek 1

Okrajšave in opredelitev pojmov

Zgornja končna točka: povzroča učinke na ravni populacije.

ASV: nasičenost z zrakom (air saturation value).

Biomarker: povzroča učinke na ravni posameznega osebka.

Kemikalija: snov ali zmes.

Dph: dnevi po izvalitvi (days post hatch).

DMY: na kromosom Y vezan gen z domeno DM, ki je potreben za razvoj samcev medak.

ELISA: encimski imunski test.

Teža ribe: mokra teža ribe (osušene s pivnikom).

FSDT: preskus spolnega razvoja rib.

Os HPG: os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze.

Dvospolne ribe: ribe z več kot enim oocitom v testisu na 6 analiziranih delov ali spermatogenimi celicami v jajčnikih (da/ne).

Stopnja obremenitve: mokra teža rib na prostornino vode.

MOA: način delovanja.

RT-PCR: verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

Nediferencirane ribe: ribe s spolnimi žlezami, ki ne kažejo zaznavnih zarodnih celic.

VTG: vitelogenin.

▼M6

Dodatek 2

Poskusni pogoji za preskus spolnega razvoja rib (sladkovodne vrste)

1. Priporočene vrste	japonska medaka (*Oryzias latipes*)	cebrica (*Danio rerio*)	zet (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Vrsta preskusa	pretočni ali polstatični	pretočni ali polstatični	pretočni ali polstatični
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kakovost osvetljenosti	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)
5. Jakost svetlobe	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)
6. Obdobje osvetljenosti	12–16 ur svetlobe, 8–12 ur teme	12–16 ur svetlobe, 8–12 ur teme	16 ur svetlobe, 8 ur teme
7. Najmanjša velikost komore	posamezne komore morajo vsebovati vsaj 7 l vode	posamezne komore morajo vsebovati vsaj 7 l vode	posamezne komore morajo vsebovati vsaj 7 l vode
8. Zamenjave prostornin preskusnih raztopin	vsaj 5 na dan	vsaj 5 na dan	vsaj 5 na dan
9. Starost preskusnih organizmov ob začetku izpostavljenosti	novo oplojene ikre (zgodnji stadij blastule)	novo oplojene ikre (zgodnji stadij blastule)	novo oplojene ikre
10. Št. iker na tretiranje	najmanj 120	najmanj 120	najmanj 120
11. Št. tretiranj	najmanj 3 (plus ustrezno št. kontrol)	najmanj 3 (plus ustrezno št. kontrol)	najmanj 3 (plus ustrezno št. kontrol)
12. Št. ponovitev na tretiranje	najmanj 4 (razen v primeru razporeditve v kontrole na podlagi kvadratnega korena)	najmanj 4 (razen v primeru razporeditve v kontrole na podlagi kvadratnega korena)	najmanj 4 (razen v primeru razporeditve v kontrole na podlagi kvadratnega korena)
13. Način hranjenja	živa *Artemia*, zamrznjeni odrasli morski rakci, hrana v kosmičih itd.; priporočeno je hranjenje dvakrat na dan	posebna hrana za zarod, živa *Artemia*, zamrznjeni odrasli morski rakci, hrana v kosmičih itd.; priporočeno je hranjenje dvakrat na dan	živa *Artemia*, zamrznjeni odrasli morski rakci, hrana v kosmičih itd.; priporočeno je hranjenje dvakrat na dan
14. Prezračevanje	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 70 % nasičenosti

▼**M6**

15. Voda za redčenje	čista površinska voda, vodovodna voda ali modelna razredčevalna voda	čista površinska voda, vodovodna voda ali modelna razredčevalna voda	čista površinska voda, vodovodna voda ali modelna razredčevalna voda
16. Trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biološke končne točke	uspešnost izvalitve, preživetje, morfologija velikih organov, VTG histologija spolnih žlez, genetski spol razmerje med spoloma	uspešnost izvalitve, preživetje morfologija velikih organov, VTG histologija spolnih žlez, razmerje med spoloma	uspešnost izvalitve, preživetje morfologija velikih organov, VTG histologija spolnih žlez, razmerje med spoloma
18. Merila sprejemljivosti preskusa za združene ponovitve kontrol	uspešna izvalitev > 80 %	uspešna izvalitev > 80 %	uspešna izvalitev > 80 %
	preživetje po izvalitvi ≥ 70 %	preživetje po izvalitvi ≥ 70 %	preživetje po izvalitvi ≥ 70 %
	rast (mokra teža ribe, osušena s pivnikom) > 150 mg	rast (mokra teža ribe, osušena s pivnikom) > 75 mg	rast (mokra teža ribe, osušena s pivnikom) > 120 mg
	dolžina (standardna dolžina) > 20 mm	dolžina (standardna dolžina) > 14 mm	dolžina (standardna dolžina) > 20 mm
	razmerje med spoloma (% samcev ali samic) 30 %–70 %	razmerje med spoloma (% samcev ali samic) 30 %–70 %	razmerje med spoloma (% samcev ali samic) 30 %–70 %

▼**M6**

Dodatek 3

Kemijske značilnosti sprejmljive vode za redčenje

SESTAVINA	KONCENTRACIJA
delci	< 20 mg/l
skupni organski ogljik	< 2 mg/l
neionizirani amoniak	< 1 µg /l
ostanek klora	< 10 µg /l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l

▼**M6**

Dodatek 4

Iz preskusne metode C.14/Smernica za preskusne koncentracije

Stolpec (število koncentracij med 100 in 10 ali med 10 in 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Iz stolpca se lahko izbere serija treh (ali več) zaporednih koncentracij. Vmesne vrednosti med koncentracijami v stolpcu (x) so v stolpcu (2x + 1). Navedene vrednosti lahko predstavljajo koncentracije, izražene v odstotkih na prostornino ali težo (mg/l ali µg/l). Vrednosti se lahko množijo ali delijo s katero koli potenco števila 10, kot je ustrezno. Stolpec 1 se lahko uporabi, če je ugotovljena znatna negotovost stopnje strupenosti.

▼M6

Dodatek 5

Smernica za homogenizacijo glave in repa mladic cebrice, črnoglavega pisanca, zeta in japonske medake

Namen tega razdelka je opisati postopke, ki se izvedejo pred kvantifikacijo koncentracije VTG. Uporabijo se lahko tudi drugi postopki, katerih rezultat je primerljiva kvantifikacija VTG. Koncentracija VTG se lahko namesto v homogenatu glave/repa določi v krvni plazmi ali jetrih.

Postopek

1. Ribe se anestezirajo in evtanazirajo v skladu z opisom preskusa.

2. Glava in rep ribe se odrežeta v skladu z opisom preskusa. **Opozorilo**: med ravnanji s posameznimi ribami je treba vse instrumente za seciranje in rezalno desko sprati in ustrezno očistiti (npr. s 96-odstotnim etanolom), da se prepreči „onesnaženje“ neinduciranih samcev z VTG samic ali induciranih samcev.

3. Teža zbranih glav in repov posameznih rib se izmeri na najbližji miligram.

4. Po tehtanju se deli vnesejo v ustrezne epruvete (npr. 1,5-mililitrske epruvete) in zamrznejo pri – 80 °C do homogenizacije oz. dokler se neposredno ne homogenizirajo na ledu z dvema plastičnima pestiloma. (Druge metode se lahko uporabijo, če se izvajajo na ledu in zagotovijo homogeno maso.) **Opozorilo**: *epruvete je treba ustrezno oštevilčiti, da se lahko glava in rep ribe povežeta z ustreznim delom telesa, uporabljenim za histologijo spolnih žlez*.

5. Ko dobimo homogeno maso, se ji doda 4–10-kratna teža tkiva ledeno mrzlega **homogenizacijskega pufra** (*) (paziti je treba na raztopino). Delo s pestiloma je treba nadaljevati, dokler zmes ni homogena. **Pomembno opozorilo**: *za vsako ribo se uporabita dve novi pestili.*

6. Vzorci se postavijo na led do začetka centrifugiranja pri **4 °C** in 50 000 g za 30 minut.

7. S pipeto se supernatant odmeri na dele po 20 do 50 µl (paziti je treba na količino) v **vsaj dve epruveti**, tako da se konica pipete potopi pod plast maščobe na površini in supernatant previdno izsesa brez delcev maščobe ali peletov.

8. Epruvete se do uporabe hranijo pri – 80 °C.

(*) *Homogenizacijski pufer:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-odstotna zmes inhibitorja protaze (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl zmesi inhibitorja protaze (ali enakovredne zmesi inhibitorja protaze).

TRIS: TRIS ULTRA PURE (ICN)

Zmes inhibitorja protaze: Sigma (za tkivo sesalcev), številka izdelka **P 8340**.

Opomba: homogenizacijski pufer je treba uporabiti na dan priprave. Med uporabo ga je treba postaviti na led.

▼M6

Dodatek 6

Smernica za kvantifikacijo vitelogenina v homogenatu glave in repa pri cebricah (*Danio rerio*) (spremenjen na podlagi Holbch idr., 2001). uporabijo se lahko drugi postopki, pri katerih se uporabljajo homologna antitelesa in raztopine

1. Mikrotiterske plošče (potrjena Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danska), predhodno premazane s 5 μg/ml lipovitelin-IgG proti cebricam, se odtajajo in trikrat sperejo s pufrom za spiranje (*).

2. Prečiščena raztopina vitelogenina ([1]) pri cebricah se serijsko razredči na 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 in 20 ng/ml v pufru za redčenje (**), vzorci pa se razredčijo vsaj 200-krat (da se prepreči vpliv matriksa) v pufru za redčenje in vnesejo na plošče. Kontrola preskusa se ponovi dvakrat. V vsako vdolbinico se doda 150 μl. Raztopine se dodajo v ponovitev in vzorce v treh ponovitvah. Čez noč se na stresalniku inkubirajo pri 4 °C.

3. Plošče se petkrat sperejo s pufrom za spiranje (*).

4. Hrenova peroksidaza (HRP), spojena z dekstranovo verigo (npr. AMDEX A/S, Danska), in konjugirana protitelesa se razredčijo v pufru za spiranje; dejanska raztopina se razlikuje po seriji in starosti. V vsako vdolbinico se doda 150 μl, plošče pa se eno uro inkubirajo na stresalniku pri sobni temperaturi.

5. Plošče se petkrat sperejo s pufrom za spiranje (*), dno plošč pa se skrbno očisti z etanolom.

6. V vsako vdolbinico se doda 150 μl TMB plus (***). Ploščo je treba pred svetlobo zaščititi z aluminijasto folijo ter opazovati razvoj barv na stresalniku.

7. Ko je umeritvena krivulja popolnoma razvita, se aktivnost encimov ustavi z vnosom 150 μl 0,2 M H_2SO_4 v vsako vdolbinico.

8. Absorpcija se meri pri 450 nm (npr. na čitalniku plošč Molecular Devices Thermomax). Podatki se analizirajo s povezano programsko opremo (npr. Softmax).

(*) Pufer za spiranje:

založni PBS (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Uravnati pH na 7,3 in napolniti do 5 l z Millipore H_2O. Hraniti pri 4 °C.

(**) Pufer za redčenje:

založni PBS (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Uravnati pH na 7,3 in napolniti do 1 l z Millipore H_2O. Hraniti pri 4 °C.

(***) TMB plus je substrat, pripravljen za uporabo, ki ga proizvaja KemEnTec (Danska). Občutljiv je na svetlobo. Hraniti pri 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), prečiščena v skladu z: Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385–398.

▼**M6**

(****) Založni PBS

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
Na_2HPO_4 $2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Uravnati pH na 6,8 in napolniti do 2 l z Millipore H_2O. Hraniti pri sobni temperaturi.

▼M6

Dodatek 7

Smernica za pripravo tkivnih rezin za določanje spola in faze spolnih žlez

Cilj tega razdelka je opisati postopke, ki se izvedejo pred oceno histoloških rezin. Uporabijo se lahko drugi postopki, katerih rezultat je podobna določitev spola in faze spolnih žlez.

Ti postopki so z nekaj izjemami podobni za japonsko medako (JMD) in cebrico (ZF).

Evtanazija, nekropsija in fiksacija tkiva

Cilji:

1. zagotoviti humano žrtvovanje ribe;

2. pridobiti potrebne teže telesa in meritve;

3. oceniti sekundarne spolne značilnosti;

4. secirati tkivo za analizo VTG;

5. fiksirati spolne žleze.

Postopki:

1. ribo je treba žrtvovati neposredno pred nekropsijo. Če ni na voljo več obducentov, se zato ne sme usmrtiti več rib hkrati;

2. riba se z majhnim sakom odstrani iz preskusne komore in prenese na območje za nekropsijo v posodi za prenos;

3. riba se vnese v raztopino za evtanazijo, riba se iz raztopine odstrani, ko neha dihati in se ne odziva na zunanje dražljaje;

4. določi se mokra teža ribe;

5. Za pripravo tkiv za analizo VTG se lahko riba postavi na plutovinasto ploščo na mizico stereomikroskopa;

   (a) pri cebrici se glava odreže neposredno za prsno plavutjo, rep pa neposredno za hrbtno plavutjo;

   (b) pri japonski medaki se trebuh odpre z natančnim prerezom ob ventralni sredinski črti od prsnega obroča do točke, kranialne na anus. Jetra se previdno odstranijo z majhno prijemalko in škarjicami;

6. vzorci za analizo VTG se vstavijo v mikroepruvete in takoj zamrznejo v tekočem dušiku;

7. trup, vključno s spolnimi žlezami, se vstavi v predhodno označene plastične kasete za tkivo, ki se prenesejo v Davidsonov ali Bouinov fiksativ. Fiksativa mora biti vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Posoda s fiksativom se pet sekund nežno pretresa, da se zračni mehurčki odstranijo iz kasete;

8. (a) vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu čez noč, naslednji dan pa se prenesejo v posamezne posode z 10-odstotnim nevtralno pufranim formalinom. Posode s kasetami se 5 sekund nežno stresajo, da se zagotovi ustrezna penetracija formalina v kasete;

▼M6

(b) tkiva ostanejo v Bouinovem fiksativu 24 ur, sledi pa prenos v 70-odstotni etanol.

Obdelava tkiva

Cilji:

1. dehidracija tkiva za ustrezno penetracijo parafina;

2. impregnacija tkiva s parafinom, da se ohrani neokrnjenost tkiva in ustvari trdna podlaga za mikrotomijo;

Postopki:

3. označene kasete s tkivom se odstranijo iz hrambe s formalinom/etanolom in postavijo v košare za obdelavo, košara za obdelavo se obremeni v napravi za obdelavo tkiva;

4. izbere se časovni načrt obdelave;

5. ko naprava za obdelavo tkiva konča obdelovalni cikel, se lahko košare prenesejo v napravo za vstavljanje.

Vstavljanje

Cilj:

ustrezna usmeritev vzorca v strjeni parafin za mikrotomijo.

Postopki:

1. košare s kasetami se odstranijo iz naprave za obdelavo in potopijo v s parafinom napolnjeno prednjo komoro grelne naprave za vstavljanje ali pa se kasete prestavijo v ločen parafinski grelnik;

2. prva kaseta, ki se bo vstavila, se odstrani iz prednje komore grelne konzole ali parafinskega grelnika. Pokrov kasete se odstrani in zavrže, na oznaki kasete pa se preverijo zabeležke o živali, da se pred vstavljanjem odpravijo morebitne neskladnosti;

3. izbere se ustrezno velik kalup za vstavljanje;

4. kalup se drži pod cevko dozirne konzole in napolni s tekočim parafinom;

5. vzorec se odstrani iz kasete in vstavi v stopljeni parafin v kalupu. To se ponovi pri 4–8 vzorcih za vsak kalup s parafinom. Mesto posamezne ribe se označi tako, da se prva riba položi pod kotom 180 stopinj glede na ribo 2–4/8;

6. vzorec se prekrije z dodajanjem dodatnega parafina;

7. kalup s podlago kasete se postavi na hladilno ploščo kriogene posode;

8. ko se parafin strdi, se blok (tj. strjeni parafin s tkivi in podlago kasete) odstrani iz kalupa.

Mikrotomija

Cilj:

rezanje in pritrditev histoloških rezin za barvanje.

Postopki:

1. začetna faza mikrotomije, ki se imenuje „seznanitev“, se izvede po naslednjih korakih:

   (a) parafinski blok se vstavi v vpenjalo mikrotoma;

   (b) vpenjalo se z vrtenjem kolesa mikrotoma pomika naprej, s parafinske površine bloka pa se režejo debele rezine, dokler nož ne doseže vstavljenih tkiv;

▼M6

(c) debelina rezine se na mikrotomu nastavi na 3–5 mikronov. Vpenjalo se pomika naprej in z bloka se odreže več rezin, da se odstranijo vsi artefakti, ki so med grobimi rezi nastali na rezalni površini tkiva;

(d) blok se lahko odstrani iz vpenjala in s srednjo stranjo naprej položi na led, da se tkivo zmoči;

2. naslednja faza mikrotomije je končno rezanje rezin in pritrditev tkivnih rezin na mikroskopske preparate. Ti postopki se izvedejo, kot sledi:

(a) če je bil blok postavljen na led, se odstrani z njega in vstavi v vpenjalo mikrotoma;

(b) vpenjalo se pri debelini rezine, nastavljene na 3–5 mikronov na mikrotomu, pomika naprej z vrtenjem kolesa mikrotoma, rezine se režejo z bloka, dokler ne dobimo „traka“, ki vsebuje vsaj eno sprejemljivo rezino s spolnimi žlezami (če je med rezanjem potrebno, se lahko blok odstrani iz vpenjala, postavi na led, da se tkivo zmoči, in vstavi nazaj v vpenjalo);

(c) rezine se plosko položijo na vodno gladino v vodni kopeli. Poskusi se obdržati vsaj eno rezino brez gub in zračnih mehurčkov, ujetih pod njo;

(d) mikroskopsko objektno stekelce se potopi pod najboljšo rezino, ki se s stekelcem dvigne iz vode. Ta postopek se imenuje „pritrditev“ rezine na preparat;

(e) za sklop rib se pripravijo tri rezine. Druga in tretja rezina se odrežeta v razmiku 50 mikronov za prvo rezino. Če ribe niso vstavljene s spolnimi žlezami v isti rezalni ravnini, je treba narediti več rezin, da se zagotovi vsaj šest rezin s spolnimi žlezami za vsako ribo;

(f) s pisalom za označevanje preparatov se na preparatu označi številka bloka, iz katerega je bil preparat ustvarjen;

(g) preparat se položi na podstavek za barvanje;

(h) blok se odstrani iz vpenjala in shrani s sprednjim delom naprej.

Barvanje, namestitev krovnega stekelca in označevanje preparatov

Cilji:

— obarvanje rezin za histopatološko preiskavo;

— trajno zatesnjeno pritrjena in obarvana tkiva;

— trajno identificirane obarvane rezine, ki omogočajo popolno sledljivost;

Postopki:

1. barvanje:

(a) preparati se pred barvanjem čez noč sušijo na zraku;

(b) rezine se barvajo s hematoksilin-eozinom;

2. namestitev krovnega stekelca:

(a) krovna stekelca se lahko namestijo ročno ali samodejno;

(b) preparat se pomoči v ksilen ali TissueClear, odvečni ksilen/TissueClear pa se nežno odstrani s preparata;

▼**M6**

(c) v bližino konca preparata nasproti zamrznjenega konca ali na krovno stekelce se nanese približno 0,1 ml pritrditvenega medija;

(d) krovno stekelce se med nameščanjem na preparat nagne pod majhnim kotom;

3. označevanje:

(a) vsaka oznaka preparata mora vsebovati naslednje informacije:

(i) ime laboratorija;

(ii) vrsto;

(iii) št. vzorca/št. Preparata;

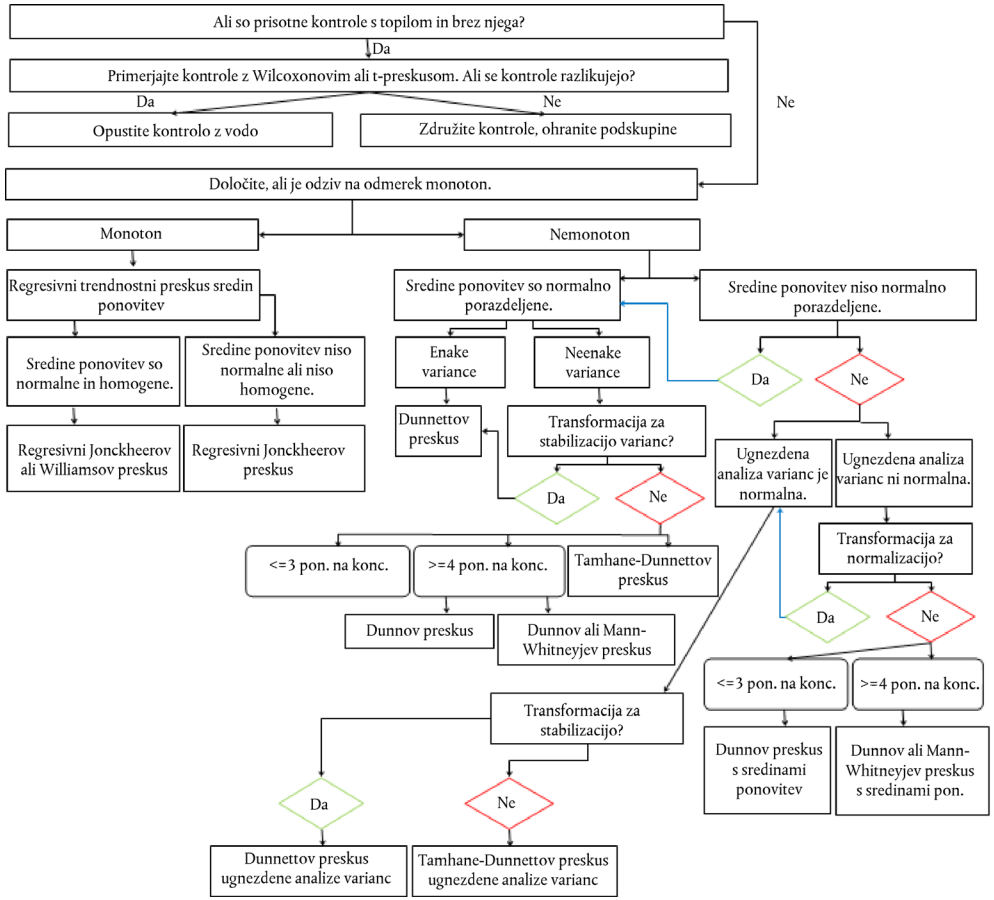
(iv) kemikalijo/skupino tretiranja;

(v) datum.

▼M6

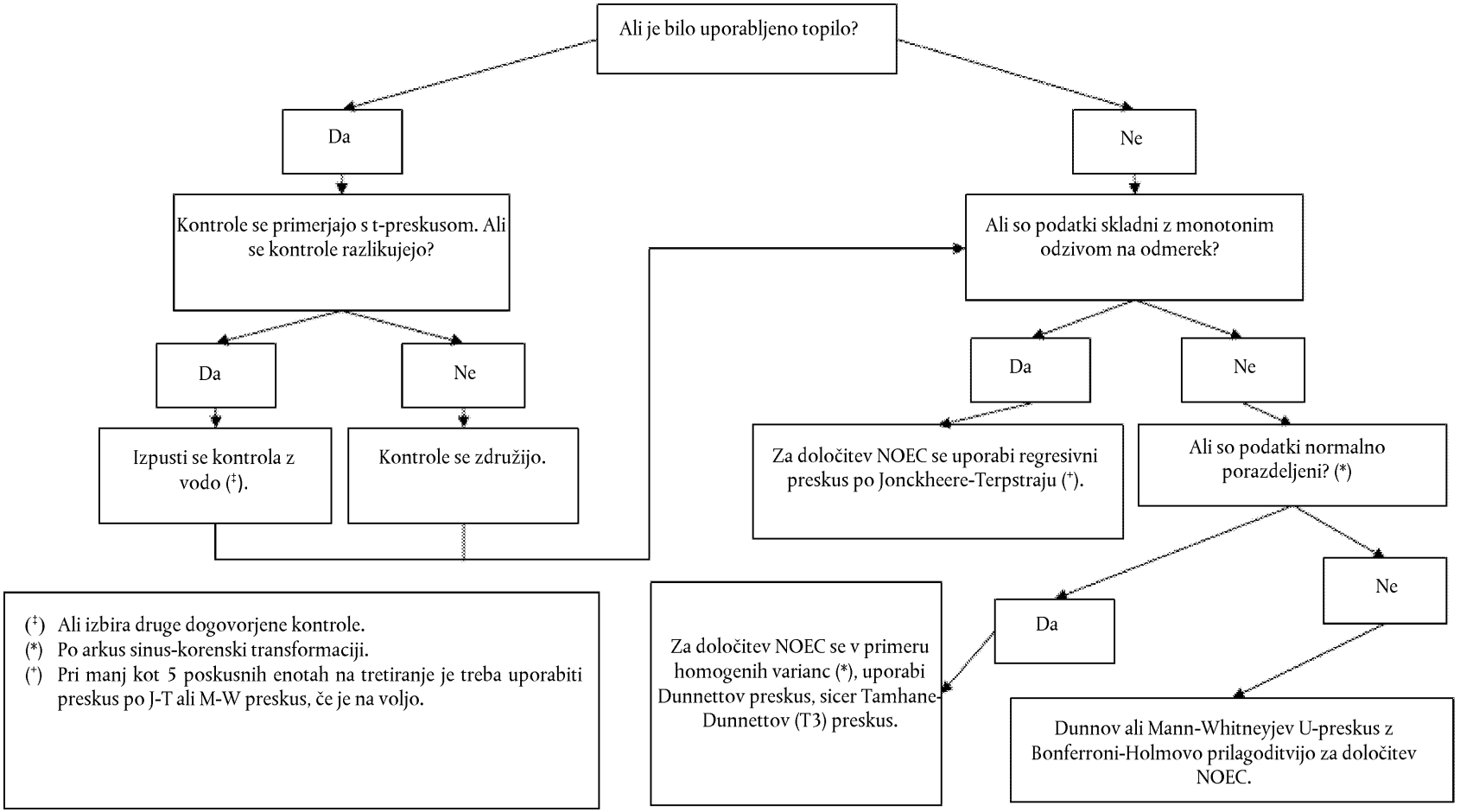
Dodatek 8

Statistični diagram poteka za analizo vitelogenina



▼M6

statisTični diagram poteka za analizo razmerja med spoloma



▼M6

Dodatek 9

Smernice za vzorčenje tkiva za določitev genetskega spola in določitev genetskega spola z metodo PCR

Vzorčenje tkiva, priprava in shranjevanje pred določanjem genetskega spola z metodo PCR pri medaki (pripravil laboratorij za vodne organizme družbe Bayer CropScience AG)

1. Pri vsaki ribi se z natančnimi škarjami odrežeta predrepna in hrbtna plavut in vstavita v epruveto s 100 µl ekstrakcijskega pufra 1 (podrobnosti o pripravi pufra so navedene v nadaljevanju). Po rezanju vsake ribe se škarje očistijo v čaši z destilirano H_2O in osušijo s papirnato brisačo.

2. Tkiva plavuti se za lizo celic homogenizirajo s teflonskim pestičem mikroepruvete. Za vsako epruveto se uporabi novo pestilo, da se prepreči onesnaženje. Pestila se čez noč pustijo v 0,5 M NaOH, 5 minut spirajo v destilirani H_2O ter do uporabe shranijo v etanolu ali sterilizirajo po avtoklaviranju.

3. Tkivo plavuti se lahko shrani tudi brez ekstrakcijskega pufra 1 na suhem ledu in nato v zamrzovalniku pri – 80 °C, da se prepreči degeneracija DNA. Vendar ekstrakcija poteka bolje, če se DNA ekstrahira hkrati (za ravnanje glej zgoraj; vzorce je treba odtajati na ledu po shranjevanju pri – 80 °C, preden se v epruvete doda pufer).

4. Po homogenizaciji se vse epruvete postavijo v vodno kopel, kjer 15 minut vrejo pri 100 °C.

5. Nato se s pipeto v vsako epruveto doda 100 µl ekstrakcijskega pufra 2 (podrobnosti o pripravi pufra so navedene v nadaljevanju). Vzorci se pri sobni temperaturi hranijo 15 minut in se pri tem občasno nežno ročno pretresejo.

6. Po tem se vse epruvete ponovno postavijo v vodno kopel, kjer še 15 minut vrejo pri 100 °C.

7. Epruvete se do nadaljnje analize zamrznejo pri – 20 °C.

Priprava pufra

Pufer PCR 1:

500 mg N-lavroilsarkozina (npr. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

k 100 ml destilirane H_2O

→ avtoklav

Pufer PCR 2:

20 g Chelex (npr. Biorad, Munich, GE)

nabrekne v 100 ml destilirane H_2O

→ avtoklav

Določanje genetskega spola (z metodo PCR) pri medaki (pripravila laboratorij za vodne organizme družbe Bayer CropScience AG in Universität Würzburg Biozentrum)

Pripravljene in zamrznjene epruvete (opisano v zgornjem oddelku) se odtajajo na ledu. Nato se centrifugirajo v mikrocentrifugirki (30 sekund pri največji hitrosti in sobni temperaturi). Za PCR se uporabi čisti supernatant iz oborine. Preprečiti je treba vsak prenos sledi Chelexa (lokaliziranega v oborini) v reakcijo PCR, saj bi to vplivalo na aktivnost Taq-polimeraze. Supernatant se uporabi neposredno ali pa se zamrzne (pri – 20 °C) in odtaja v več ciklih brez negativnega učinka na DNA za poznejše analize.

▼**M6**

1. *Priprava „reakcijske zmesi“ (25 µl na vzorec):*

	Prostornina	Končna koncentracija
Matrična DNA	0,5 µl–2 µl	
10 × pufer PCR z MgCl2	2,5 µl	1x
Nukleotidi (vsi dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Smerni začetni oligonukleotid (10 µM) (glej v nadaljevanju 3–5)	0,5 µl	200 nM
Protismerni začetni oligonukleotid (10 µM) (glej v nadaljevanju 3–5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Voda (stopnje PCR)	do 25 µl	
Taq E-polimeraza	0,3 µl	1,5 U
10 × pufer PCR z $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 pri 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM MgCl2, 0,1 % Tween 20		

Za vsako PCR (glej v nadaljevanju 3–5) je potreben poseben začetni oligonukleotid kot nova kombinacija „reakcijske zmesi“ in ustrezne količine matrične DNA, ki je potrebna za vsak vzorec (glej zgoraj). Ustrezne prostornine se s pipetami prenesejo v nove epruvete. Po tem se vse epruvete zaprejo, mešajo (približno 10 sekund) in centrifugirajo (10 sekund pri sobni temperaturi). Nato se lahko začnejo ustrezni programi PCR. V vsakem programu PCR se uporabita še pozitivna kontrola (reprezentativen vzorec DNA z znano aktivnostjo in jasnimi rezultati) in negativna kontrola (1 µl destiliranega H_2O).

2. *Priprava agaroznega gela (1 %) – med potekom programov PCR*

— 3 g agaroze se raztopijo v 300 ml pufra 1 × TAE (1-odstotni agarozni gel);

— raztopina mora vreti v mikrovalovni pečici (približno 2–3 minute);

— vročo raztopino je treba preliti v model za vlivanje, ki stoji na ledu;

— po približno 20 minutah je agarozni gel pripravljen za uporabo;

— agarozni gel se do konca programov PCR shrani v pufru 1 × TAE.

3. *Program PCR za aktin:*

namen te reakcije PCR je dokazati, da se DNA v vzorcu ne poškoduje.

— Poseben začetni oligonukleotid:

„Mact1(zgornji/smerni)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(spodnji/protismerni)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 minut pri 95 °C

Cikel (35-krat):

Denaturacija → 45 sekund pri 95 °C

Prileganje → 45 sekund pri 56 °C

Podaljševanje → 1 minuta pri 68 °C

15 minut pri 68 °C

▼M6

4. *Program PCR za gena X in Y:*

v tem programu PCR za odkrivanje genov X in Y se uporabijo vzorci neokrnjene DNA. Pri moški DNA morata biti vidni dve progi, pri ženski DNA pa ena proga (po barvanju in gelski elektroforezi). V to izvajanje programa je treba vključiti eno pozitivno kontrolo za moške (vzorec XY) in eno za ženske (vzorec XX).

— Poseben začetni oligonukleotid:

„PG 17,5“ (zgornji/smerni) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17,6“ (spodnji/protismerni) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 minut pri 95 °C

Cikel (40-krat):

Denaturacija → 45 sekund pri 95 °C

Prileganje → 45 sekund pri 55 °C

Podaljševanje → 1 minuta 30 sekund pri 68 °C

15 minut pri 68 °C

5. *Program PCR za gen Y kot „kontrola“ za program PCR za gena X in Y:*

ta program PCR preverja rezultate „programa PCR za gena X in Y“. Pri „moških vzorcih“ mora biti vidna ena proga, pri „ženskih vzorcih“ pa proge ne smejo biti vidne (po barvanju in gelski elektroforezi).

— Poseben začetni oligonukleotid:

„DMTYa (zgornji/smerni)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (spodnji/protismerni)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 minut pri 95 °C

Cikel (40-krat):

Denaturacija → 45 sekund pri 95 °C

Prileganje → 45 sekund pri 56 °C

Podaljševanje → 1 minuta pri 68 °C

15 minut pri 68 °C

6. *Barvanje vzorcev PCR*

Raztopine za barvanje

50-odstotni glicerol

100 mM EDTA

1-odstotni SDS

0,25-odstotno bromofenolno modro

0,25-odstotni ksilenksianol

V vsako epruveto se s pipeto doda 1 µl raztopine za barvanje.

7. *Začetek gelske elektroforeze:*

— pripravljeni 1-odstotni agarozni gel se prenese v komoro za gelsko elektroforezo, napolnjeno s pufrom 1 × TAE;

— v utor na agaroznem gelu se s pipeto vnese 10–15 µl obarvanega vzorca PCR;

— v ločen utor se s pipeto vnese tudi 5–15 µl Invitrogena (lestvica 1 kb);

— elektroforezo je treba začeti z 200 V;

— končati jo je treba po 30–45 minutah.

▼**M6**

8. *Določanje prog:*

— agarozni gel je treba očistiti v destilirani H_2O;

— nato je treba agarozni gel za 15–30 minut prenesti v etidijev bromid;

— po tem je treba v UV-svetlobni škatli posneti sliko agaroznega gela;

— na koncu se vzorci analizirajo glede na pozitivno kontrolno progo (ali proge) in lestvico.

▼M6

Dodatek 10

Smernica za vzorčenje tkiva za določitev genetskega spola z metodo PCR pri zetu

Vzorčenje tkiva in ekstrakcija DNA

DNA se lahko ekstrahira z različnimi komercialno dostopnimi reagenti ter ročnimi in samodejnimi ekstrakcijskimi sistemi. V nadaljevanju je opisan protokol, ki se uporablja v laboratoriju Cefas Weymouth, kjer je potrebno, pa so bili dodani alternativni pristopi.

1. Z vsake posamezne ribe se z natančnimi škarjami odstrani majhen kos tkiva (10–20 mg) z dorzolateralnega območja (ko se odstranita glava in rep za analizo VTG). Tkivo se vnese v epruveto in postavi neposredno na tekoči dušik (za shranjevanje pri – 80 °C) ali napolni s 70-odstotnim etanolom (za prenos in naknadno shranjevanje pri 4 °C). Škarje se po uporabi za posamezno ribo očistijo v 70-odstotnem etanolu in nato v destilirani vodi ter osušijo s papirnato brisačo.

2. Etanol (če je bil uporabljen) se odstrani z aspiracijo, tkivo pa se čez noč razkroji s proteinazo K v 400 µl pufra ATL (Qiagen). Alikvot (200 µl) produkta razkroja se prenese v 96-mestni S-blok (Qiagen), DNA pa se ekstrahira v 96-mestnem formatu s sistemom Qiagen Universal BioRobot in priborom QIamp Investigator BioRobot. DNA se eluira v 50 µl proste vode DNaze in RNaze. Če se za ekstrakcijo DNA uporabljajo trda tkiva (kot je bodica ali prsna plavut), bo morda treba vzorec homogenizirati v liznem pufru s sistemom za lizo tkiva FastPrep® ali enakovrednim sistemom za razkroj tkiva.

   Ali pa:

   (a) tkivo se čez noč razkraja s proteinazo K v 400 µl liznega pufra G2 (Qiagen), DNA pa se ekstrahira iz 200 µl produkta razkroja z enostavnim priborom EZ-1 DNA Tissue Kit in EZ-1 BioRobot ali enostavnim priborom DNA Mini Kit. DNA se eluira v 50 µl zmesi;

   (b) tkiva se obdelajo z reagentom DNAzol. Vzorci tkiv se v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki 10 minut razkrajajo v 1 ml DNAzola in nato 5 minut centrifugirajo pri 13 000 o/min, da se odstranijo vsi delci. Vzorec, ki je prestal lizo, se prenese v novo 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko s 500 µl 100-odstotnega molekularno čistega etanola in nato 10 minut centrifugira pri 13 000 o/min, da se DNA obori. Etanol se odstrani in nadomesti s 400 µl 70-odstotnega etanola molekulske stopnje, 5 minut centrifugira pri 13 000 o/min, kosi DNA pa se raztapljajo v 50 µl proste vode molekulske DNaze in RNaze. Če se uporabljajo trda tkiva (prsna plavut), bo morda treba vzorec pred ekstrakcijo DNA homogenizirati v liznem pufru s sistemom za lizo tkiva FastPrep® ali enakovrednim sistemom za razkroj tkiva.

3. DNA se shranjuje pri – 20 °C, dokler se ne potrebuje.*Pomembno opozorilo:* med postopki je treba nositi rokavice.

Analiza verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Amplifikacije so se izvedle z 2,5 µl ekstrakta DNA v 50 µl reakcijske zmesi z začetnimi oligonukleotidi lokusov (kot je opisano v Peichel idr., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

smerni začetni oligonukleotid	5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′;
protismerni začetni oligonukleotid	5′ TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3′.

▼**M6**

Reagente PCR dobavljajo številni dobavitelji. V nadaljevanju opisana metoda se trenutno uporablja v laboratoriju Cefas Weymouth.

1. *Priprava „reakcijske zmesi“ (50 µl na vzorec):*

Izhodiščna zmes se pripravi, kot sledi. Pripravi se lahko vnaprej in se do uporabe shrani zamrznjena pri – 20 °C. Pripraviti je treba zadostno izhodiščno zmes za negativno kontrolo (samo voda stopnje molekularne biologije).

	Prostornina (založna koncentracija)/vzorec	Končna koncentracija
Reakcijski pufer 5xGoTaq®	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM vsak)	250 µM vsak
Smerni začetni oligonukleotid	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Protismerni začetni oligonukleotid	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Voda stopnje molekularne biologije	30,75 µl	
Polimeraza GoTaq	0,25 µl	1,25 U

— V označeno 0,5-mililitrsko epruveto za PCR s tankimi stenami se odmeri 47,5 µl.

— V ustrezno označeno epruveto se doda 2,5 µl čiste DNA. Postopek se ponovi za vse vzorce in negativno kontrolo.

— Prekrije se z dvema kapljicama mineralnega olja. Namesto tega se lahko uporabi ciklični termostat z ogrevanim pokrovom.

— Pokrovi se zaprejo.

— Vzorci so se 5 minut denaturirali v cikličnem termostatu PTC-225 pri 94 ± 2 °C, temu pa je sledilo 39 enominutnih ciklov pri 94 ± 2 °C, 55 ± 2 °C in 72 ± 2 °C ter na koncu desetminutno podaljševanje pri 72 ± 2 °C.

2. *Priprava agaroznega gela (2 %):*

Proizvodi PCR se običajno razgradijo na 20-odstotnem agaroznem gelu, ki vsebuje etidijev bromid.

Uporabi se lahko tudi kapilarni sistem elektroforeze.

— Dva grama agaroze se odtehtata v 100 ml pufra 1 × TAE.

— Pogreje se v mikrovalovni pečici (približno 2–3 minute), da se agaroza raztopi.

— Dodata se 2 kapljici končne koncentracije etidijevega bromida 0,5 µg/ml.

— Vroča raztopina se prenese v opremo za ulitje gela.

— Gel naj se strdi.

3. *Gelska elektroforeza:*

— Agarozni gel se prenese v opremo za elektroforezo in potopi v pufer 1 × TAE.

— V ločene vdolbinice se vnese 20 µl vsakega vzorca, pri čemer se v prosto vdolbinico doda molekulski velikostni standard (lestvica DNA 100 bp, Promega).

— Elektroforeza se 30–45 minut izvaja pri 120 V.

▼**M6**

4. *Vizualizacija proizvodov amplifikacije*

Če je bil v agarozni gel vključen etidijev bromid, kot je opisano zgoraj, se proizvodi DNA vizualizirajo pod virom UV. V nasprotnem primeru se agarozni gel obarva tako, da se gel pred vizualizacijo za 30 minut prekrije z razredčeno raztopino etidijevega bromida (0,5 μg/ml v vodi).

▼M6

Dodatek 11

Smernica za postopek umetne oploditve pri zetu

Namen tega razdelka je opisati postopke za pridobitev oplojenih iker zeta za uporabo v preskusu spolnega razvoja rib.

Postopki

Pridobivanje semenčic samcev

1. Evtanazira se dobro obarvan samec želene populacije.

2. Moda se odrežejo z obeh strani ribe. *Moda so običajno močno pigmentirane paličaste strukture, ki so že vidne ob lateralni sredinski črti telesa*. Uporabi se lahko katera koli od naslednjih metod.

3. Z natančnimi škarjami se naredi 1–1,5-centimetrski rez z enim prerezom pod kotom približno 45 stopinj, ki se začne pri kloaki.

4. S skalpelom se naredi majhen rez na boku ribe nekoliko posteriorno na medenico in ventralno na lateralne ploščice.

5. Moda se odstranijo s finimi kleščami in vstavijo v petrijevko.

6. Vsako modo se prekrije s 100 µl sveže narejene **Hankove končne raztopine** ([1]).

7. Moda se fino narežejo na kocke z britvico ali skalpelom. Pri tem se sprostijo semenčice, ki dajo Hankovi raztopini mlečen videz.

8. Tekočina s semenčicami se vnese v epruveto, pri čemer se pazi, da se s pipetiranjem vanjo ne vnesejo deli mod.

9. V epruveto se doda 800 µl Hankove končne raztopine in dobro premeša.

10. Po potrebi se lahko samec konzervira s fiksiranjem v 100-odstotnem etanolu ali drugem želenem fiksativu. To je zlasti pomembno, če se v okviru študije določa izvor potomstva glede na starše.

Pomembno opozorilo: *čeprav se lahko večina potrebnih založnih raztopin pripravi vnaprej, je treba* ***zalogo 5*** *in zato* **končno raztopino** *pripraviti* **svežo** *na dan uporabe*.

Zaloga 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilirana voda	100 ml
Zaloga 2	
Na_2HPO_4 (brezvodni)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Destilirana voda	100 ml
Zaloga 3	
$CaCl_2$	0,72 g
Destilirana voda	50 ml

([1]) Hankova pufrana raztopina soli (HBSS):
HBBS je potrebna za konzerviranje semenčic med pripravo za oploditev.

▼M6

Zaloga 4

$MgSO_4$ $7H_2O$	1,23 g
Destilirana voda	50 ml

Zaloga 5 (sveže pripravljena)

$NaHCO_3$	0,35 g
Destilirana voda	10 ml

Opomba: če že imate nekatere od navedenih soli, vendar z drugačno vsebnostjo vode (tj. $2H_2O$ namesto brezvodne), jih lahko uporabite, vendar najprej prilagodite maso na podlagi molekulske mase.

Za Hankovo končno raztopino se po naslednjem vrstnem redu združijo:

zaloga 1	1,0 ml
zaloga 2	0,1 ml
zaloga 3	0,1 ml
destilirana voda	8,6 ml
zaloga 4	0,1 ml
zaloga 5	0,1 ml

Pred uporabo dobro premešajte.

Oploditev

1. V želeni populaciji se določijo velike in gravidne samice; samice so pripravljene na stiskanje šele, ko se vidijo ikre, ki izstopajo iz kloake. Za pripravljene samice je značilna „pokončna“ drža.

2. S prstom oz. palcem se nežno premika po boku ribe do repa, da se spodbudi izločitev vrečke z ikrami v svežo petrijevko. Postopek se ponovi na drugi strani in riba vrne v posodo.

3. Ikre se lahko razporedijo (tvorijo enoslojno plast) s finim čopičem. Pomembno je, da se poskusi čim več iker izpostaviti semenčicam, k čemur pripomore čim večja površina iker. Pomembno opozorilo: ikre morajo biti vlažne, zato se obložijo z vlažnim robcem (pomembno je, da se ikre ne dotikajo vode neposredno, saj bi lahko horij, ki preprečuje oploditev, prehitro otrdel). Samice se zelo razlikujejo po številu iker, ki ga lahko proizvedejo, vendar bi moralo biti v povprečju iz ene gravidne samice enostavno pridobiti približno 150 iker.

4. Po celotni površini iker se s čopičem enakomerno porazdeli 25µl semenčic v Hankovi zmesi. Ko se oplojevanje začne, bodo ikre hitro otrdele in spremenile barvo (v minuti). Če se oceni, da je iker več kot 150, se postopek ponovi. Če ikre ne otrdijo v minuti, se doda nekaj semenčic. Pomembno opozorilo: z dodajanjem semenčic se stopnja oplojenosti morda ne bo izboljšala.

5. Ikre in raztopina s semenčicami morajo biti v stiku vsaj 15 minut, oplojene ikre pa je treba vstaviti v akvarij za izpostavljanje v uri in pol po oploditvi.

6. Postopek se ponovi z drugo samico, dokler ni zbrano želeno število iker.

7. Nekaj iker zadnje serije se prihrani in fiksira v 10-odstotni ocetni kislini.

▼M6

Štetje in razporeditev iker v preskusnem akvariju

1. Ikre je treba enakomerno porazdeliti med vsako stopnjo tretiranja, da se prepreči genetska nagnjenost. Vsako serijo oplojenih iker je treba razporediti v enako velike skupine (toliko, kot je stopenj tretiranja) s topim instrumentom (npr. s širokimi entomološkimi kleščami ali inokulacijsko zanko). Če so cilj štiri ponovitve na tretiranje, pri čemer je v vsaki 20 iker, je treba razdeliti 80 iker na akvarij za izpostavljanje. Pomembno opozorilo: priporočljivo je dodati dodatnih 20 % (tj. 96 iker na stopnjo tretiranja), dokler se ne zagotovi 100-odstotna oploditev.

2. Ikre zeta so zelo nagnjenje h glivičnim okužbam izven gnezdišč, ki jih varujejo samci. Zato je ključnega pomena, da se vse ikre prvih pet dni preskusa tretirajo z metilensko modrim. Založna raztopina metilensko modrega se pripravi z 1 mg/ml in doda v akvarij za izpostavljanje, kjer je največja končna koncentracija 2,125 mg/l. Pomembno opozorilo: zeti se ne smejo izpostaviti metilensko modremu, ko se izvalijo, zato v sistemu za ublažitev do šestega dne ne sme biti več metilensko modrega.

3. Ikre se vsak dan pregledajo, pri čemer je treba dokumentirati vse mrtve ali neoplojene ikre. Pomembno opozorilo: dokler se ikre ne izvalijo, ne smejo zapustiti vode niti za krajši čas.

▼M6

C.42 BIOLOŠKA RAZGRADLJIVOST V MORSKI VODI

SPLOŠNI UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 306 (1992). Ko so bile pripravljene izvirne preskusne metode, ni bilo znano, v kakšnem obsegu bi se lahko rezultati presejalnih preskusov lahke biološke razgradljivosti z uporabo sladke vode in komunalne odplake ali aktivnega blata kot inokuluma, uporabili za morsko okolje. V zvezi s tem so bili sporočeni različni rezultati (npr. (1)).

2. Veliko industrijskih odpadnih voda, ki vsebujejo različne kemikalije, doseže morje z neposrednim izpustom ali prek rečnih ustij in rek, v katerih so zadrževalni časi kratki v primerjavi z obdobjem, ki je potrebno za popolno biološko razgradnjo številnih prisotnih kemikalij. Zaradi vedno večje ozaveščenosti o potrebi, da je treba morsko okolje zaščititi pred vedno večjo obremenitvijo s kemikalijami in oceniti verjetno koncentracijo kemikalij v morju, so bile razvite preskusne metode za biološko razgradljivost v morski vodi.

3. Pri metodah, opisanih v tem poglavju, se naravna morska voda uporablja kot vodna faza in vir mikroorganizmov. V okviru prizadevanj za skladnost z metodami za lahko biološko razgradljivost v sladki vodi sta se proučevali uporaba ultrafiltrirane in centrifugirane morske vode ter uporaba morskih usedlin kot inokulumov. Ta proučevanja niso bila uspešna. Preskusni medij je zato naravna morska voda, predhodno tretirana, da se odstranijo grobi delci.

4. Da bi se lahko končna biološka razgradljivost ocenila z metodo stresanja bučke, je treba zaradi slabe občutljivosti analitske metode za raztopljeni organski ogljik (DOC) uporabiti razmeroma visoke koncentracije preskusne snovi. Zato je treba dodajati morsko vodo z mineralnimi hranilnimi snovmi (N in P), saj bi njihove nizke koncentracije sicer omejile odstranitev raztopljenega organskega ogljika. Pri metodi stresanja bučke je treba zaradi koncentracije dodane preskusne snovi dodati tudi hranilne snovi.

5. Zato metode niso preskusi za lahko biološko razgradljivost, ker se mikroorganizmom, ki so že prisotni v morski vodi, ne doda inokulum. Preskusi tudi niso simulacija morskega okolja, saj se dodajo hranilne snovi, koncentracija preskusne snovi pa je veliko višja, kot bi bila prisotna v morju. Zato se metode predlagajo v novem podrazdelku „Biološka razgradljivost v morski vodi“.

UPORABA

6. Rezultati preskusa, ki bi se uporabili, ker sta vzorec uporabe in odstranjevanje zadevne snovi pokazala pot do morja, dajejo prvi vtis o biološki razgradljivosti v morski vodi. Če je rezultat pozitiven (> 70 % odstranjenega raztopljenega organskega ogljika; > 60 % teoretične potrebe po kisiku (TPK)), se lahko ugotovi, da je biološka razgradnja v morskem okolju mogoča. Vendar negativen rezultat ne izključuje takega potenciala, ampak kaže, da je potrebna nadaljnja študija, na primer z uporabo čim nižje koncentracije preskusne snovi.

▼M6

7. Če je potrebna bolj končna vrednost hitrosti ali stopnje biološke razgradnje v morski vodi na določenem mestu, je v vsakem primeru treba uporabiti zahtevnejše, bolj prefinjene in zato dražje metode. Simulacijski preskus bi se na primer lahko uporabil s koncentracijo preskusne snovi, ki je bliže verjetni koncentraciji v okolju. Uporabila bi se lahko tudi neobogatena morska voda, ki ni predhodno tretirana, iz aktualne lokacije, primarna biološka razgradnja pa bi se lahko spremljala s specifično kemijsko analizo. Za končno biološko razgradljivost bi bile potrebne snovi, označene s ^{14}C, da bi se lahko izmerile hitrosti izginjanja topnega organskega ^{14}C in nastajanje $^{14}CO_2$ pri pogojih, ki so realni za okolje.

IZBIRA METOD

8. Izbira metode, ki se bo uporabila, je odvisna od številnih dejavnikov. Naslednja tabela bo pripomogla k izbiri. Čeprav snovi, ki so topne v vodi pod ekvivalentom približno 5 mg C/l, z metodo stresanja bučke ni mogoče preskusiti, se lahko z njo načeloma preskusijo vsaj slabo topne snovi.

Tabela

Prednosti in slabosti metode stresanja bučke ter preskusa v zaprti steklenici

METODA	PREDNOSTI	SLABOSTI
STRESANJE BUČKE	— enostavna oprema, razen analizatorja za C, — trajanje 60 dni ni težava, — ni motenj zaradi nitrifikacije, — lahko se prilagodi hlapnim snovem,	— potreben je analizator za C, — uporabi se 5–40 mg DOC/l, lahko ima inhibitorni učinek, — določitev DOC je zahtevna pri nizkih koncentracijah v morski vodi (učinek klora), — DOC je v morski vodi občasno visoka,
ZAPRTA STEKLENICA	— enostavna oprema, — enostavna določitev konca, — uporablja se nizka koncentracija preskusne snovi (2 mg/l), zato je manjša verjetnost zaviranja, — enostavna prilagoditev hlapnim snovem,	— morda je težko ohranjati nepredušnost steklenic, — zaradi rasti bakterij po stenah so lahko rezultati napačni, — slepe vrednosti absorpcije O_2 so lahko visoke zlasti po 28 dneh; lahko se preprečijo s staranjem morske vode, — mogoče motnje absorpcije O_2 zaradi nitrifikacije

METODA STRESANJA BUČKE

UVOD

1. Ta metoda je različica prilagojenega presejalnega preskusa OECD, opisanega v poglavju C.4B te priloge (2). Končna različica je bila pripravljena kot rezultat krožnega preskusa, ki ga je za Evropsko komisijo pripravil danski inštitut za kakovost vode (3).

2. Tako kot pri spremljajočem preskusu v zaprti steklenici se rezultati tega preskusa ne smejo obravnavati kot kazalniki lahke biološke razgradljivosti, ampak se morajo uporabiti izrecno za pridobivanje informacij o biološki razgradljivosti snovi v morskih okoljih.

▼M6

NAČELO METODE

3. Predhodno določena količina preskusne snovi se raztopi v preskusnem mediju, da nastane koncentracija 540 mg raztopljenega organskega ogljika (DOC)/l. Če se meje občutljivosti analiz organskega ogljika izboljšajo, lahko ima prednost uporaba nižjih koncentracij preskusne snovi, zlasti za inhibitorne snovi. Raztopina preskusne snovi v preskusnem mediju se inkubira z mešanjem v temi ali difuzni svetlobi v aerobnih pogojih pri stalni temperaturi (vzdrževani v razponu ± 2 °C), ki je običajno v obsegu 15–20 °C. Kadar je cilj študije simulacija okoljskih razmer, se lahko preskusi izvedejo izven običajnega temperaturnega razpona. Priporoča se, da preskus ne traja dlje kot približno 60 dni. Razgradnja sledi meritvam raztopljenega organskega ogljika (končna razgradnja) in v nekaterih primerih specifični analizi (primarna razgradnja).

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

4. Da bi vedeli, ali se lahko preskus uporabi za določeno snov, morajo biti znane nekatere njene lastnosti. Določiti je treba vsebnost organskega ogljika v snovi, njena hlapnost ne sme povzročati bistvenih izgub med potekom preskusa, njena topnost v vodi pa mora biti večja ali enaka 2 540 mg C/l. Poleg tega se preskusna snov ne sme znatno adsorbirati na steklene površine. Za razlago dobljenih rezultatov so potrebne informacije o čistosti ali relativnih deležih glavnih sestavin preskusne snovi, zlasti kadar so rezultati mejni.

5. Informacije o strupenosti preskusne snovi za bakterije, kot se na primer meri v kratkotrajnih preskusih stopnje respiracije (4), so lahko koristne pri izbiri primernih preskusnih koncentracij in so lahko bistvene za pravilno razlago nizkih vrednosti biološke razgradnje. Vendar take informacije niso vedno zadostne za razlago rezultatov, dobljenih v preskusu biološke razgradnje, pri čemer je ustreznejši postopek, ki je opisan v odstavku 18.

REFERENČNE SNOVI

6. Da se preveri mikrobna dejavnost vzorca morske vode, je treba uporabiti ustrezne referenčne snovi. Primeri snovi, ki se lahko uporabijo v ta namen, so natrijev benzoat, natrijev acetat in anilin. Referenčne snovi se morajo razgraditi v razumnem času, sicer se priporoča, da se preskus ponovi z drugim vzorcem morske vode.

7. Pri krožnem preskusu za Evropsko komisijo, kjer so bili vzorci morske vode odvzeti na različnih lokacijah in v različnih časovnih obdobjih (3), sta bila lag faza (t_L) in čas do 50-odstotne razgradnje (t_{50}), ki ne vključuje lag faze, od 1 do 4 dni oziroma od 1 do 7 dni za natrijev benzoat. Za anilin je bil t_L od 0 do 10dni, t_{50} pa od 1 do 10 dni.

OBNOVLJIVOST IN OBČUTLJIVOST METODE

8. Obnovljivost metode je bila določena s krožnim preskusom (3). Najnižjo koncentracijo preskusne snovi, za katero se lahko ta metoda uporabi z analizo raztopljenega organskega ogljika, v veliki meri določata meja zaznavnosti analize organskega ogljika (približno 0,5 mg C/l) in koncentracija raztopljenega organskega ogljika v uporabljeni morski vodi (običajno 35 mg/l za vodo iz odprtega morja). Osnovna koncentracija raztopljenega

▼M6

organskega ogljika ne sme preseči približno 20 % skupne koncentracije raztopljenega organskega ogljika po dodajanju preskusne snovi. Če to ni izvedljivo, se lahko osnovna koncentracija raztopljenega organskega ogljika občasno zniža s staranjem morske vode pred preskušanjem. Če se metoda uporabi le s specifično kemijsko analizo (s katero se meri primarna razgradnja), mora raziskovalec z zagotavljanjem dodatnih informacij dokumentirati, ali se lahko pričakuje končna razgradljivost. Dodatne informacije lahko vključujejo rezultate drugih preskusov za lahko ali inherentno biološko razgradljivost.

OPIS METODE

Oprema

9. Običajna laboratorijska oprema in:

a. stresalnik, primeren za erlenmajerice prostornine 0,52 litra, bodisi z avtomatskim uravnavanjem temperature bodisi v prostoru s konstantno temperaturo 15–20 °C, ki se vzdržuje v razponu ± 2 °C;

b. erlenmajerice z ozkim grlom, prostornine 0,52 litra;

c. naprava za membransko filtracijo ali centrifuga;

d. membranski filtri, 0,2–0,45 μm;

e. analizator ogljika;

f. oprema za specifično analizo (neobvezno).

Morska voda

10. V temeljito očiščeno posodo se odvzem vzorec morske vode in prenese v laboratorij, po možnosti v enem ali dveh dneh po odvzemu. Zagotovi se, da temperatura vzorca med prevozom ne bo znatno presegla temperature, ki bo uporabljena v preskusu. Natančno se opredeli lokacija vzorčenja in opiše njegovo stanje v zvezi z onesnaženostjo in hranilnimi snovmi. V opredelitev se zlasti pri obalnih vodah vključita število heterotrofnih mikrobnih kolonij ter določitev koncentracij raztopljenega nitrata, amoniaka in fosfata.

11. Za vzorec morske vode se navedejo naslednje informacije:

— datum odvzema,

— globina odvzema,

— videz vzorca – moten itd.,

— temperatura v času odvzema,

— slanost,

— raztopljeni organski ogljik,

— čas od odvzema do uporabe v preskusu.

12. Če se ugotovi, da je vsebnost raztopljenega organskega ogljika v vzorcu morske vode previsoka (odstavek 8), je priporočeno, da se morska voda pred uporabo stara približno en teden. Staranje poteka v aerobnih pogojih pri preskusni temperaturi in v temi ali pri difuzni svetlobi. Po potrebi je

▼M6

treba aerobne pogoje vzdrževati z rahlim prezračevanjem. Med staranjem se vsebnost lahko razgradljive organske snovi zmanjša. Krožni preskus (3) ni pokazal razlike med možnostjo razgradnje staranih in sveže odvzetih vzorcev morske vode. Morska voda se pred uporabo tretira tako, da se odstranijo grobi delci, npr. s filtriranjem skozi najlonski filter ali filter papir (ne membranski filter ali filter GF/C) ali s sedimentacijo in odlivanjem. Uporabljeni postopek je treba navesti. Če se izvede staranje, se po njem izvede predhodno tretiranje.

Založne raztopine za mineralne hranilne snovi

13. Iz analitsko čistih reagentov se pripravijo naslednje založne raztopine.

(a)	Kalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalijev hidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatrijev hidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Amonijev klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	
(b)	Kalcijev klorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	
(c)	Magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	
(d)	Železov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	

Obarjanje v raztopini (d) bi se lahko preprečilo z dodajanjem ene kapljice koncentrirane HCl ali 0,4 g etilendiamintetraocetne kisline (EDTA, dinatrijeva sol) na liter. Če se obarjenje pojavi v založni raztopini, se nadomesti s svežo raztopino.

Priprava preskusnega medija

14. Doda se 1 ml vsake od zgornjih založnih raztopin na liter predhodno tretirane morske vode.

Inokulum

15. Mikroorganizmom, ki so že prisotni v morski vodi, se ne doda poseben inokulum. Število heterotrofov, ki v preskusnem mediju morske vode tvorijo kolonije (in po možnosti tudi v izvirnih vzorcih morske vode), se (neobvezno) določi npr. s štetjem kolonij na ploščah, za kar se uporabi morski agar. To je zlasti zaželeno za vzorce iz obalnih ali onesnaženih mest. Heterotrofna mikrobna dejavnost v morski vodi se preveri s preskusom z referenčno snovjo.

▼M6

Priprava bučk

16. Zagotovi se, da bo vsa steklena posoda temeljito očiščena, vendar ne nujno sterilna (npr. z alkoholno klorovodikovo kislino), sprana in posušena pred uporabo, da se prepreči onesnaženje z ostanki iz prejšnjih preskusov. Bučke je treba očistiti tudi pred prvo uporabo.

17. Preskusne snovi v dveh bučkah se ocenijo hkrati, skupaj z bučko za referenčno snov. V dveh ponovitvah se izvede slepi preskus brez preskusne ali referenčne snovi za določanje analitskih slepih vzorcev. Preskusne snovi, ki se lahko ustrezno dodajo prek koncentrirane založne raztopine, se raztopijo v preskusnem mediju, da se zagotovijo želene začetne koncentracije, ki so običajno 540 mg DOC/l. Referenčna snov se normalno preskusi pri začetni koncentraciji, ki ustreza 20 mg DOC/l. Če se uporabijo založne raztopine preskusnih in/ali referenčnih sovi, se zagotovite, da se slanost medija morske vode ne spremeni bistveno.

18. Če se lahko pričakujejo strupeni učinki ali jih ni mogoče izključiti, je v načrt preskusa priporočljivo vključiti dve ponovitvi preskusa zaviranja. Preskusna in referenčna snov se dodata v isto posodo, pri čemer naj bo zaradi primerjave koncentracija referenčne snovi običajno enaka kot pri kontrolnem preskusu (tj. 20 mg DOC/l).

19. V erlenmajerice se odmerijo primerne prostornine preskusnih raztopin (primerna količina ne presega polovice prostornine erlenmajeric), nato pa se vse erlenmajerice ohlapno pokrijejo (npr. z aluminijasto folijo), tako da bo mogoča izmenjava plinov med bučko in okoliškim zrakom. (Če se uporablja analiza raztopljenega organskega ogljika, vata ni primerna.) Posode se postavijo na stresalnik in se ves čas preskusa neprekinjeno stresajo pri zmernih obratih (npr. 100 o/min). Temperatura (15–20 °C v razponu ± 2 °C) se nadzoruje in posode se zaščitijo pred svetlobo, da se prepreči rast alg. Zagotovi se, da v zraku ni strupenih snovi.

Fizikalno-kemijski kontrolni preskus (neobvezno)

20. Če obstaja sum abiotske razgradnje ali mehanizma izgub, kot je hidroliza (težava le pri specifični analizi), izhlapevanje ali adsorpcija, je priporočljivo izvesti fizikalno-kemijski kontrolni preskus. Izvede se lahko z vnosom živosrebrovega (II) klorida ($HgCl_2$) ([1]) (50– 100 mg/l) v posode s preskusno snovjo, da se ustavi mikrobna dejavnost. Znatno zmanjšanje raztopljenega organskega ogljika ali koncentracije specifične snovi v fizikalno-kemijskem kontrolnem preskusu kaže abiotske mehanizme odstranjevanja. (Če se uporabi živosrebrov klorid, je treba pri analizi raztopljenega organskega ogljika paziti na motnje ali zastrupitev katalizatorja.)

Število bučk

21. V značilnem poteku preskusa se uporabijo naslednje bučke:

bučki 1 in 2 – vsebujeta preskusno snov (preskusno suspenzijo),

bučki 3 in 4 – vsebujeta le morsko vodo (slepi),

bučka 5 – vsebuje referenčno snov (kontrola postopka),

bučka 6 – vsebuje preskusno in referenčno snov (kontrola strupenosti) – neobvezna,

bučka 7 – vsebuje preskusno snov in sterilizacijsko sredstvo (abiotska sterilna kontrola) – neobvezna.

([1]) Živosrebrov (II) klorid ($HgCl_2$) je zelo strupena snov, pri kateri je treba uporabljati ustrezne varnostne ukrepe. Vodne odpadke, ki vsebujejo to kemikalijo, je treba ustrezno odložiti. Ne smejo se izpustiti v sistem za odpadne vode.

▼M6

Analiza raztopljenega organskega ogljika

22. Med potekom preskusa se v ustreznih razmikih odvzamejo vzorci za analizo raztopljenega organskega ogljika (Dodatek 1). Vzorci se vedno odvzamejo na začetku preskusa (dan 0) in 60. dan. Za opis časovnega poteka razgradnje je skupaj potrebnih vsaj pet vzorcev. Fiksnega časovnega razporeda vzorčenja ni mogoče določiti, ker se hitrost biološke razgradnje razlikuje. Za vsak vzorec se določi raztopljeni organski ogljik v dveh ponovitvah.

Vzorčenje

23. Potrebna prostornina vzorcev je odvisna od analitske metode (specifična analiza), uporabljenega analizatorja ogljika in postopka (membranska filtracija ali centrifugiranje), izbranega za tretiranje vzorca pred določanjem ogljika (odstavka 25 in 26). Pred vzorčenjem je treba zagotoviti, da je preskusni medij dobro premešan in da se material, prilepljen na steno bučke, raztopi ali suspendira.

24. Membransko filtracijo ali centrifugiranje je treba izvesti takoj po vzorčenju. Po potrebi se filtrirani ali centrifugirani vzorci shranijo pri 2–4 °C za največ 48 ur ali pod – 18 °C za daljša obdobja (vzorec se pred shranjevanjem zakisa na pH 2, če je znano, da to ne bo vplivalo na snov).

25. Membranski filtri (0,2–0,45 μm) so primerni le, če je zagotovljeno, da med filtriranjem ne izpuščajo ogljika in ne adsorbirajo snovi; npr. polikarbonski membranski filtri. Nekateri membranski filtri so impregnirani s površinsko aktivnimi snovmi za hidrofilizacijo in lahko sprostijo velike količine raztopljenega ogljika. Takšne filtre je treba pripraviti z vrenjem v deionizirani vodi tri zaporedna obdobja, pri čemer eno traja eno uro. Po vrenju je treba filtre shraniti v deionizirani vodi. Prvih 20 ml filtrata se zavrže.

26. Namesto membranske filtracije se lahko izbere centrifugiranje vzorcev. Centrifugira se 15 minut pri 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g), po možnosti v ohlajeni centrifugi.

Opomba: zdi se, da razlikovanje skupnega organskega ogljika (TOC) od raztopljenega organskega ogljika (TOC/DOC) s centrifugiranjem pri zelo nizkih koncentracijah ni mogoče, saj se bodisi ne odstranijo vse bakterije bodisi se ogljik kot del bakterijske plazme ponovno raztopi. Pri višjih preskusnih koncentracijah (> 10 mg C na liter) se zdi napaka pri centrifugiranju primerljivo majhna.

Pogostost vzorčenja

27. Če se analize izvajajo takoj po vzorčenju, se naslednji čas vzorčenja oceni ob upoštevanju rezultata analitskega določanja.

28. Če se vzorci ohranijo (odstavek 24) za poznejšo analizo, je treba odvzeti več kor pet vzorcev, kolikor je potrebno najmanjše število. Zadnji vzorec se analizira najprej, pri čemer je mogoče s postopno „vzvratno“ izbiro ustreznih vzorcev pridobiti dober opis krivulje biološke razgradnje z razmeroma majhnim številom analitskih določitev. Če do konca preskusa ne pride do razgradnje, ni treba analizirati dodatnih vzorcev, pri čemer se lahko v takem primeru z „vzvratno“ strategijo prihrani veliko analitskih stroškov.

▼M6

29. Če se na krivulji razgradnje pred 60. dnem opazi ravnotežje, je treba preskus končati. Če je očitno, da se je razgradnja začela pred 60. dnem, vendar ni dosegla ravnotežja, se preskus podaljša za dodatno obdobje.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

30. Rezultati analize se zabeležijo na priloženi podatkovni list (Dodatek 2), vrednosti biološke razgradnje za preskusno in referenčno snov pa se izračunajo po naslednji enačbi:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

pri čemer je:

D_t = razgradnja v odstotku raztopljenega organskega ogljika ali odstranitev specifične snovi ob času t,

C_o = začetna koncentracija raztopljenega organskega ogljika ali specifične snovi v preskusnem mediju,

C_t = koncentracija raztopljenega organskega ogljika ali specifične snovi v preskusnem mediju ob času t,

$C_{bl(0)}$ = začetna koncentracija raztopljenega organskega ogljika ali specifične snovi v slepem vzorcu,

$C_{bl(t)}$ = koncentracija raztopljenega organskega ogljika ali specifične snovi v slepem vzorcu ob času t.

31. Razgradnja se navede kot odstotek odstranitve raztopljenega organskega ogljika (končna razgradnja) ali odstranitve specifične snovi (primarna razgradnja) ob času t. Koncentracije raztopljenega organskega ogljika se izračunajo na najbližji 0,1 mg na liter, srednje vrednosti D_t pa se zaokrožijo na najbližji celi odstotek.

32. Potek razgradnje se grafično prikaže na diagramu, kot je prikazano na sliki „Veljavnost in razlaga rezultatov“. Če je na voljo dovolj podatkov, se iz krivulje izračunata lag faza (t_L) in čas do 50-odstotne odstranitve od konca lag faze (t_{50}).

Poročilo o preskusu

33. V poročilu o preskusu morajo biti naslednje informacije:

Preskusna snov:

— fizikalna narava in, kadar je to primerno, fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijski podatki.

Preskusni pogoji:

— lokacija in opis mesta vzorčenja, stanje v zvezi z onesnaženostjo in hranilnimi snovmi (število kolonij, amoniak, fosfat, če je primerno),

— značilnosti vzorca (datum vzorčenja, globina, videz, temperatura, slanost, raztopljeni organski ogljik (neobvezno), čas med odvzemom in uporabo v preskusu),

▼M6

— metoda staranja morske vode, če je bila uporabljena,

— uporabljena metoda za predhodno tretiranje (filtracija/sedimentacija) morske vode,

— uporabljena metoda za določitev raztopljenega organskega ogljika,

— uporabljena metoda za specifično analizo (neobvezno),

— uporabljena metoda za določitev števila heterotrofov v morski vodi (metoda štetja kolonij na ploščah ali alternativni postopek) (neobvezno),

— druge metode (neobvezno), uporabljene za opis značilnosti morske vode (merjenje ATP itd.).

Rezultati:

— analitski podatki, navedeni na podatkovnem listu (Dodatek 2),

— potek preskusa razgradnje se grafično prikaže na diagramu, ki kaže lag fazo (t_L), naklon in čas (z začetkom ob koncu lag faze) do 50-odstotne odstranitve (t_{50}). Lag faza se lahko grafično oceni, kot je prikazano na sliki v razdelku „Veljavnost in razlaga rezultatov“, ali se ustrezno šteje kot čas, potreben za 10-odstotno razgradnjo,

— odstotek razgradnje, izmerjen po 60 dneh ali ob koncu preskusa.

Razprava o rezultatih.

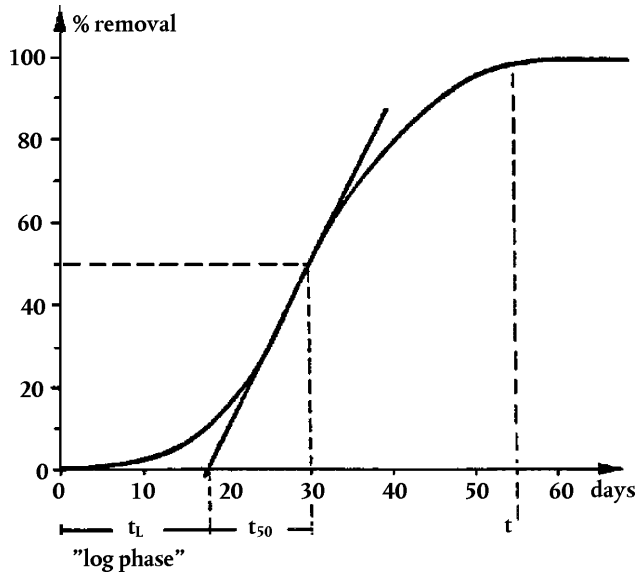
Veljavnost in razlaga rezultatov

34. Rezultati, pridobljeni z referenčnimi snovmi, npr. natrijevim benzoatom, natrijevim acetatom ali anilinom, morajo biti primerljivi z rezultati, pridobljenimi s krožnim preskusom (3) (glej razdelek „Referenčne snovi“, odstavek 7). Če so rezultati, pridobljenimi z referenčnimi snovmi, netipični, je treba preskus ponoviti z drugim vzorcem morske vode. Čeprav rezultatov preskusov zaviranja zaradi prispevka raztopljenega organskega ogljika, ki ga zagotovi preskusna snov, ni vedno mogoče enostavno razlagati, je znatno zmanjšanje stopnje odstranitve skupnega raztopljenega organskega ogljika v primerjavi s stopnjo iz kontrole pozitiven znak za strupene učinke.

35. Zaradi uporabljenih razmeroma visokih preskusnih koncentracij v primerjavi z večino naravnih sistemov (in zato neugodnim razmerjem med koncentracijami preskusnih snovi in drugih virov ogljika) se metoda šteje za predhodni preskus, ki se lahko uporabi za ugotovitev, ali je snov lahko biološko razgradljiva. V skladu s tem nizek rezultat ne pomeni nujno, da preskusna snov v morskem okolju ni biološko razgradljiva, ampak kaže, da bo za to ugotovitev potrebnega več dela.

Na spodnji sliki je prikazan teoretičen poskus razgradnje, ki kaže izvedljiv način ocene vrednosti t_L (dolžina lag faze) in t_{50} (časovno obdobje, ki se začne pri t_L), potrebnih za 50-odstotno odstranitev.

▼M6



METODA Z ZAPRTO STEKLENICO

UVOD

1. Ta metoda je različica preskusa v zaprti steklenici (5) za morsko vodo, katere končna različica je bila pripravljena kot rezultat krožnega preskusa, ki ga je za Evropsko komisijo pripravil danski inštitut za kakovost vode (3).

2. Tako kot pri spremljajoči metodi stresanja bučke se rezultati tega preskusa ne smejo obravnavati kot kazalniki lahke biološke razgradljivosti, ampak se morajo uporabiti izrecno za pridobivanje informacij o biološki razgradljivosti snovi v morskih okoljih.

NAČELO METODE

3. Predhodno določena količina preskusne snovi se raztopi v preskusnem mediju v koncentraciji, ki je običajno 2– 10 mg preskusne snovi na liter (uporabi se lahko ena koncentracija ali več). Raztopina se v polni zaprti steklenici hrani v temi v kopeli ali posodi s konstantno temperaturo, ki se vzdržuje na ± 1 °C v razponu 15–20 °C. Kadar je cilj študije simulacija okoljskih razmer, se lahko preskusi izvedejo izven običajnega temperaturnega razpona, če se nadzor temperature ustrezno prilagodi. Razgradnji sledijo analize kisika v 28-dnevnem obdobju.

4. Krožni preskus je pokazal, da v večini primerov zaradi resnih motenj ne bi bilo mogoče zbrati koristnih informacij, če bi se preskus podaljšal na več kot 28 dni. Slepe vrednosti biokemijske potrebe po kisiku (BPK) so bile verjetno pretirano visoke zaradi rasti po stenah, ki jo povzroča pomanjkanje mešanja, in nitrifikacije. Zato je priporočeno trajanje preskusa 28 dni, če pa slepe vrednosti biokemijske potrebe po kisiku ostanejo v okviru 30-odstotne meje (odstavka 15 in 40), se lahko preskus podaljša.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

5. Da bi vedeli, ali se lahko preskus uporabi za določeno snov, morajo biti znane nekatere njene lastnosti. Empirična formula je potrebna, da se lahko izračuna teoretična potreba po kisiku (TPK) (glej dodatek 3); v nasprotnem primeru je treba določiti kemijsko potrebo snovi po kisiku (KPK), ki se šteje za referenčno vrednost. Uporaba kemijske potrebe po kisiku je manj zadovoljiva, ker nekatere snovi v preskusu kemijske potrebe po kisiku ne oksidirajo popolnoma.

▼M6

6. Topnost snovi mora biti vsaj 2 mg/l, čeprav se načeloma lahko preskusijo tudi manj topne snovi (npr. z ultrazvočnim razbijanjem) in hlapne snovi. Za razlago dobljenih rezultatov so potrebne informacije o čistosti ali relativnih deležih glavnih sestavin preskusne snovi, zlasti kadar so rezultati mejni.

7. Informacije o strupenosti snovi za bakterije, kot se na primer meri v kratkotrajnih preskusih respiracije (4), so lahko zelo koristne pri izbiri primernih preskusnih koncentracij in so lahko bistvene za pravilno razlago nizkih vrednosti biološke razgradnje. Vendar take informacije niso vedno zadostne za razlago rezultatov, dobljenih v preskusu biološke razgradnje, pri čemer je ustreznejši postopek, ki je opisan v odstavku 27.

REFERENČNE SNOVI

8. Da se preveri mikrobna dejavnost vzorca morske vode, je treba uporabiti ustrezne referenčne snovi. Za ta namen se lahko uporabi (na primer) anilin, natrijev acetat ali natrijev benzoat. Pri teh snoveh se mora v razumnem času pojaviti vsaj 60-odstotna razgradnja (njihove teoretične potrebe po kisiku), sicer se priporoča, da se preskus ponovi z drugim vzorcem morske vode.

9. Pri krožnem preskusu za Evropsko komisijo, kjer so bili vzorci morske vode odvzeti na različnih lokacijah in v različnih časovnih obdobjih, sta bila lag faza (t_L) in čas do 50-odstotne razgradnje (t_{50}), ki ne vključuje lag faze, od 0 do 2 dni oziroma od 1 do 4 dni za natrijev benzoat. Za anilin sta bili vrednosti t_L in t_{50} od 0 do 7 dni oziroma od 2 do 12 dni.

OBNOVLJIVOST

10. Obnovljivost metod je bila določena s krožnim preskusom za Evropsko komisijo (3).

OPIS METODE

Oprema

11. Običajna laboratorijska oprema in:

(a) uporabijo se lahko BPK-steklenice s steklenimi zamaški in prostornino 250–300 ml ali steklenice z ozkim grlom in prostornino 250 ml;

(b) več dvo-, tri- ali štirilitrskih steklenic z oznakami za litre za pripravo preskusa in polnjenje BPK-steklenic;

(c) vodna kopel ali prostor s konstantno temperaturo za shranjevanje steklenic pri konstantni temperaturi (± 1 °C), kjer ni svetlobe;

(d) oprema za analizo raztopljenega kisika;

(e) membranski filtri, 0,2–0,45 μm (neobvezno);

(f) oprema za specifično analizo (neobvezno).

Morska voda

12. V temeljito očiščeno posodo se odvzame vzorec morske vode in prenesite v laboratorij, po možnosti v enem ali dveh dneh po odvzemu. Zagotovi se, da temperatura vzorca med prevozom ne bo znatno presegla temperature, ki bo uporabljena v preskusu.

▼M6

13. Natančno se opredeli lokacija vzorčenja in opiše njeno stanje v zvezi z onesnaženostjo in hranilnimi snovmi. V opredelitev se zlasti pri obalnih ali onesnaženih vodah vključita število heterotrofnih mikrobnih kolonij ter določitev koncentracij raztopljenega nitrata, amoniaka in fosfata.

14. Za vzorec morske vode se navedejo naslednje informacije:

— datum odvzema,

— globina odvzema,

— videz vzorca – moten itd.,

— temperatura v času odvzema,

— slanost,

— raztopljeni organski ogljik (DOC),

— čas od odvzema do uporabe v preskusu.

15. Če se ugotovi, da je vsebnost raztopljenega organskega ogljika v vzorcu visoka ali če se zdi, da bi bila slepa biokemijska potreba po kisiku po 28 dneh več kot 30 % potrebe referenčne snovi, se priporoča, da se morska voda pred uporabo stara približno en teden.

16. Staranje vzorca poteka v aerobnih pogojih pri preskusni temperaturi in v temi ali difuzni svetlobi. Po potrebi je treba aerobne pogoje vzdrževati z rahlim prezračevanjem. Med staranjem se vsebnost lahko razgradljive organske snovi zmanjša. Krožni preskus (3) ni pokazal razlike med možnostjo razgradnje staranih in sveže odvzetih vzorcev morske vode.

17. Morska voda se pred uporabo tretira tako, da se odstranijo grobi delci, npr. s filtriranjem skozi najlonski filter ali filter papir (ne membranski filter ali filter GF/C) ali s sedimentacijo in odlivanjem. Uporabljeni postopek je treba navesti. Če se izvede staranje, je treba izvesti tudi predhodno tretiranje.

Založne raztopine za mineralne hranilne snovi

18. Iz analitsko čistih reagentov se pripravijo naslednje založne raztopine.

(a)	Kalijev dihidrogen ortofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalijev hidrogen ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatrijev hidrogen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Amonijev klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	
(b)	Kalcijev klorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	
(c)	Magnezijev sulfat heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	
(d)	Železov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Raztopiti in dopolniti do 1 litra z destilirano vodo.	

▼M6

Obarjanje v raztopini (d) bi se lahko preprečilo z dodajanjem ene kapljice koncentrirane HCl ali 0,4 g etilendiamintetraocetne kisline (EDTA, dinatrijeva sol) na liter. Če se obarjenje pojavi v založni raztopini, se nadomesti s svežo raztopino.

Priprava preskusnega medija

19. Na liter predhodno tretirane morske vode se doda 1 ml vsake od zgornjih založnih raztopin. Preskusni medij se nasiči z zrakom pri preskusni temperaturi, tako da se 20 minut prezračuje s čistim stisnjenim zrakom. Za namene kontrole se določi koncentracija raztopljenega kisika. Nasičena koncentracija raztopljenega kisika kot funkcija slanosti in temperature se lahko odčita iz nomograma, priloženega tej preskusni metodi (Dodatek 4).

Inokulum

20. Mikroorganizmom, ki so že prisotni v morski vodi, se ne doda poseben inokulum. Število heterotrofov, ki v preskusnem mediju morske vode tvorijo kolonije (in po možnosti tudi v izvirnem vzorcu morske vode), se (neobvezno) določi npr. s štetjem kolonij na ploščah, za kar se uporabi morski agar. To je zlasti zaželeno za vzorce iz obalnih ali onesnaženih mest. Heterotrofna mikrobna dejavnost v morski vodi se preveri s preskusom z referenčno snovjo.

Priprava preskusnih steklenic

21. Izvedejo se vsi potrebne priprave, vključno s staranjem in predhodno tretiranje morske vode pri izbrani preskusni temperaturi med 15 in 20 °C, ter zagotovi čistost, vendar ne sterilnost steklene posode.

22. Pripravijo se skupine BPK-steklenic za določanje biokemijske potrebe po kisiku preskusne in referenčne snovi v sočasnih preskusnih nizih. Vse analize se izvedejo na dveh steklenicah (slepi vzorci, referenčna in preskusna snov), tj. za vsako določanje se pripravita dve steklenici. Analize se izvajajo vsaj na dan 0 ter 5., 15. in 28. dan (štiri določitve). Pri analizah kisika je za štiri določitve skupaj potrebnih $3 \times 2 \times 4 = 24$ steklenic (slepi vzorec, referenčna in preskusna snov) in zato približno 8 litrov preskusnega medija (za eno koncentracijo preskusne snovi).

23. V ustrezno velikih steklenicah (odstavek 11) se pripravijo ločene raztopine preskusne in referenčne snovi, tako da se v delno napolnjene velike steklenice najprej neposredno ali s koncentrirano založno raztopino dodata preskusna in založna snov. Preskusni medij se dodaja, dokler ne nastanejo končne želene koncentracije. Če se uporabijo založne raztopine preskusnih in/ali referenčnih sovi, je treba zagotoviti, da se slanost medija morske vode ne spremeni bistveno.

24. Koncentracije preskusne in referenčne snovi se izberejo ob upoštevanju:

(a) topnosti raztopljenega kisika v morski vodi pri prevladujoči preskusni temperaturi in slanosti (glej priloženi nomogram v Dodatku 4);

(b) slepe biokemijske potrebe morske vode po kisiku in

(c) pričakovane biološke razgradljivosti preskusne snovi.

▼M6

25. Topnost raztopljenega kisika je pri 15 °C in 20 °C ter slanosti 32 delov na tisoč (oceanska voda) približno 8,1 oziroma 7,4 mg/l. Poraba kisika morske vode same (respiracija v slepem vzorcu) je lahko 2 mg O_2/l ali več, če morska voda ni starana. Zato se za zagotovitev ostanka znatne koncentracije kisika po oksidaciji preskusne snovi za snovi, ki bi se morale v preskusnih pogojih popolnoma razgraditi (kot so referenčne snovi), uporabi začetna koncentracija preskusne snovi, ki je približno 23 mg/l (odvisno od teoretične potrebe po kisiku). Manj razgradljive snovi se preskusijo pri nižjih koncentracijah, tj. do 10 mg/l, če se ne pojavijo strupeni učinki. Prednost lahko ima izvedba vzporednih preskusov z nizko (približno 2 mg/l) in visoko (približno 10 mg/l) koncentracijo preskusne snovi.

26. Vzporedno je treba določiti slepi kisik v steklenicah, ki ne vsebujejo niti preskusne niti referenčne snovi.

27. Če je treba določiti zaviralne učinke, se v ločenih velikih steklenicah (odstavek 13) pripravijo naslednji nizi raztopin:

(a) 2 mg/l lahko razgradljive snovi, npr. katere koli navedene referenčne snovi;

(b) x mg/l preskusne snovi (x je običajno 2);

(c) 2 mg/l lahko razgradljive snovi plus x mg/l preskusne snovi.

Fizikalno-kemijski kontrolni preskus (neobvezno)

28. Če se izkoristi možnost uporabe specifičnih analiz, se lahko izvede fizikalno-kemijski poskus za preverjanje, ali se je preskusna snov odstranila z abiotskimi mehanizmi, kot je hidroliza ali adsorpcija. Fizikalno-kemijski kontrolni preskus se lahko izvede z vnosom živosrebrovega (II) klorida ($HgCl_2$) ([1]) (50– 100 mg/l) v dve bučki s preskusno snovjo, da se ustavi mikrobna dejavnost. Znatno zmanjšanje koncentracije specifične snovi med preskusom kaže abiotske mehanizme odstranjevanja.

Število BPK-steklenic pri značilnem poteku preskusa

29. Pri značilnem poteku preskusa se uporabijo naslednje steklenice:

— vsaj 8 steklenic s preskusno snovjo,

— vsaj 8 steklenic izključno z morsko vodo, ki je okrepljena s hranilnimi snovmi,

— vsaj 8 steklenic z referenčno snovjo in po potrebi,

— 6 steklenic s preskusno in referenčno snovjo (kontrola strupenosti).

POSTOPEK

30. Takoj po pripravi je treba vsako raztopino izčrpati iz spodnje četrtine (ne z dna) ustrezno velike steklenice in z njo napolniti ustrezno skupino BPK-steklenic. V kontrolah nič (čas nič) se takoj analizira raztopljeni kisik (odstavek 33) ali pa se shranijo za poznejšo kemijsko analizo z obarjanjem z $MnCl_2$ (manganov (II) klorid) in NaOH (natrijev hidroksid).

([1]) Živosrebrov (II) klorid ($HgCl_2$) je zelo strupena snov, pri kateri je treba uporabljati ustrezne varnostne ukrepe. Vodne odpadke, ki vsebujejo to kemikalijo, je treba ustrezno odložiti. Ne smejo se izpustiti neposredno v sistem za odpadne vode.

▼M6

31. Preostale vzporedne BPK-steklenice se inkubirajo pri preskusni temperaturi (15–20 °C), shranijo v temi in umaknejo z inkubacijskega območja v ustreznih časovnih razmikih (npr. vsaj po 5, 15 in 28 dneh), pri čemer se v njih analizira raztopljeni kisik (odstavek 33).

32. Vzorci za specifično analizo se 15 minut membransko filtrirajo (0,2–0,45 μm) ali centrifugirajo (neobvezno). Če se ne analizirajo takoj, se hranijo pri 2–4 °C za največ 48 ur oz. pri – 18 °C za daljša obdobja (vzorec se pred shranjevanjem zakisa na pH 2, če je znano, da to ne bo vplivalo na snov).

Določanje raztopljenega kisika

33. Koncentracija raztopljenega kisika se določi s kemijsko ali elektrokemijsko metodo, ki je nacionalno ali mednarodno priznana.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

34. Na priložene podatkovne liste se zabeležijo analitski rezultati (Dodatek 5).

35. Biokemijska potreba po kisiku se izračuna kot razlika porabe kisika med slepim vzorcem in raztopino preskusne snovi v preskusnih pogojih. Neto poraba kisika se deli s koncentracijo (m/v) snovi, da se biokemijska potreba po kisiku izrazi kot BPK/mg preskusne snovi. Razgradnja je opredeljena kot razmerje med biokemijsko potrebo po kisiku in po možnosti teoretično potrebo po kisiku (TPK) ali kemijsko potrebo po kisiku (KPK) ter izražena v odstotkih (glej odstavek 36).

36. Za vsak čas vzorčenja se za preskusno in referenčno snov izračunajo vrednosti biološke razgradnje z eno od naslednjih enačb:

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg tested\ substance}{mg\ ThOD/mg tested\ substance} \times 100$$

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg tested\ substance}{mg\ COD/mg tested\ substance} \times 100$$

pri čemer je:

TPK = teoretična potreba po kisiku (izračun, Dodatek 3),

KPK = kemijska potreba po kisiku, določena s poskusom.

Opomba: občasno načina izračuna (odstotek teoretične potrebe po kisiku ali odstotek kemijske potrebe po kisiku) ne zagotovita enakih rezultatov; priporoča se uporaba teoretične potrebe po kisiku, ker v preskusu kemijske potrebe po kisiku nekatere snovi ne oksidirajo popolnoma.

37. Potek preskusa razgradnje se grafično prikaže na diagramu (glej primer v razdelku „Veljavnost in razlaga rezultatov“). Če je na voljo dovolj podatkov, se iz krivulje biološke razgradnje izračunata lag faza (t_L) in čas (t_{50}) do 50-odstotne odstranitve od konca lag faze.

38. Če se uporabi specifična analiza (neobvezno), se odstotek primarne razgradnje navede kot odstotek odstranitve specifične snovi v preskusnem obdobju (popravljen za analitske slepe vzorce).

▼M6

Poročilo o preskusu

39. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna snov:

— fizikalna narava in, kadar je to primerno, fizikalno-kemijske lastnosti,

— identifikacijski podatki.

Preskusni pogoji:

— lokacija in opis mesta vzorčenja: stanje v zvezi z onesnaženostjo in hranilnimi snovmi (število kolonij, nitrat, amoniak, fosfat, če je ustrezno),

— značilnosti vzorca (datum vzorčenja, globina, videz, temperatura, slanost, raztopljeni organski ogljik (neobvezno), čas med odvzemom in uporabo v preskusu),

— metoda staranja morske vode, če je bila uporabljena,

— uporabljena metoda za predhodno tretiranje (filtracija/sedimentacija) morske vode,

— uporabljena metoda za določanje kemijske potrebe po kisiku (če se je izvedlo),

— uporabljena metoda za meritve kisika,

— postopek disperzije za snovi, ki so v preskusnih pogojih slabo topne,

— uporabljena metoda za določitev števila heterotrofov v morski vodi (metoda štetja kolonij na ploščah ali alternativni postopek),

— uporabljena metoda za določanje raztopljenega organskega ogljika v morski vodi (neobvezno),

— uporabljena metoda za specifično analizo (neobvezno),

— druge neobvezne metode, uporabljene za opis značilnosti morske vode (merjenje ATP itd.).

Rezultati:

— analitski podatki, navedeni na podatkovnem listu (kot je priložen, Dodatek 5),

— potek preskusa razgradnje, grafično prikazan na diagramu, ki kaže lag fazo (t_L), naklon in čas (z začetkom ob koncu lag faze) do 50-odstotne odstranitve končne porabe kisika zaradi oksidacije preskusne snovi (t_{50}). Lag faza se lahko grafično oceni, kot je prikazano na priloženi sliki, ali se ustrezno šteje kot čas, potreben za 10-odstotno razgradnjo,

— odstotek razgradnje, izmerjen po 28 dneh.

Razprava o rezultatih.

Veljavnost in razlaga rezultatov

40. Respiracija v slepem vzorcu ne sme preseči 30 % kisika v preskusni steklenici. Če tega merila ni mogoče izpolniti s sveže odvzeto morsko vodo, je treba morsko vodo pred uporabo starati (stabilizirati).

41. Upoštevati je treba možnost, da lahko snovi, ki vsebujejo dušik, vplivajo na rezultate.

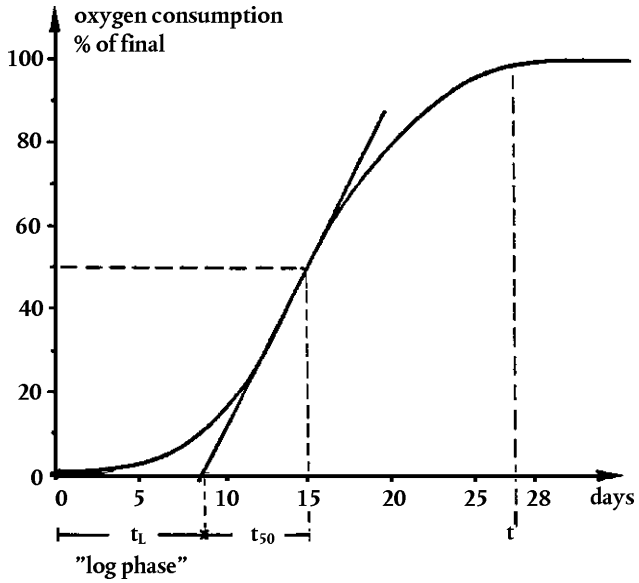
▼M6

42. Rezultati, pridobljeni z referenčnima snovema benzoatom in anilinom, morajo biti primerljivi z rezultati, pridobljenimi s krožnim preskusom (3) (odstavek 9). Če so rezultati, pridobljenimi z referenčnimi snovmi, netipični, je treba preskus ponoviti z drugim vzorcem morske vode.

43. Preskusna snov se lahko šteje za zaviralno za bakterije (pri uporabljeni koncentraciji), če je biokemijska potreba zmesi referenčne in preskusne snovi po kisiku manjša od vsote biokemijske potrebe ločenih raztopin obeh snovi po kisiku.

44. Zaradi razmeroma visokih preskusnih koncentracij v primerjavi z večino naravnih sistemov in zato neugodnim razmerjem med koncentracijami preskusne snovi in drugih virov ogljika se metoda šteje za predhodni preskus, ki se lahko uporabi za ugotovitev, ali je snov lahko biološko razgradljiva. V skladu s tem nizek rezultat ne pomeni nujno, da preskusna snov v morskem okolju ni biološko razgradljiva, ampak kaže, da bo za to ugotovitev potrebnega več dela.

Na spodnji sliki je prikazan teoretičen poskus razgradnje, ki kaže izvedljiv način ocene vrednosti t_L (dolžina lag faze) in t_{50}, časovnega obdobja (ki se začne pri tL), potrebnega za 50-odstotno končno porabo kisika zaradi oksidacije preskusne snovi.



LITERATURA

(1) de Kreuk, J. F., in Hanstveit, A. O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Poglavje C.4-B te priloge: Določanje „dobre“ biorazgradljivosti – Del III: Prilagojeni presejalni preskus OECD.

(3) Nyholm, N., in Kristensen, P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984– 1985, marec 1987, Komisija Evropskih skupnosti.

(4) Poglavje C.11 te priloge: Biorazgradnja – preskus zaviranja dihanja aktivnega blata

(5) Poglavje C.4-E te priloge: Določanje „dobre“ biorazgradljivosti – Del VI: Preskus z zaprto steklenico.

▼M6

Dodatek 1

Določanje organskega ogljika v morski vodi

METODA STRESANJA BUČKE

Za določanje organskega ogljika v vzorcu vode organske spojine v vzorcu oksidirajo v ogljikov dioksid običajno z eno od naslednjih treh tehnik:

— mokra oksidacija s persulfatom/ultravijoličnim obsevanjem,

— mokra oksidacija s persulfatom/zvišano temperaturo (116–130 °C),

— sežiganje.

Sproščeni CO_2 se kvantificira z uporabo infrardeče spektrometrije ali titrimetrije. Druga možnost je redukcija CO_2 na metan, ki se kvantificira s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID).

Metoda s persulfatom/ultravijoličnim obsevanjem se običajno uporablja za analizo „čiste“ vode z nizko vsebnostjo delcev. Zadnji metodi se lahko uporabljata za večino vzorcev vode, pri čemer je metoda s persulfatom/zvišano temperaturo najprimernejša za vzorce nizke stopnje, sežigalna tehnika pa za vzorce z vsebnostjo nehlapnega organskega ogljika (NVOC) veliko nad 1 mg C/l.

Motnje

Vse tri metode so odvisne od izločevanja ali izravnave anorganskega ogljika, ki je prisoten v vzorcu. Najpogosteje uporabljena metoda za izločevanje anorganskega ogljika je spiranje CO_2 iz zakisanega vzorca, čeprav se s tem izgubijo tudi hlapne organske spojine (1). Za vsako matriko vzorčenja je treba zagotoviti popolno izločitev ali izravnavo anorganskega ogljika, glede na vrsto vzorca pa je treba poleg nehlapnega organskega ogljika določiti hlapni organski ogljik (VOC).

Visoke koncentracije klorida so razlog za manjšo učinkovitost oksidacije z uporabo metode s persulfatom/ultravijoličnim obsevanjem (2). Vendar se lahko ta motnja prepreči z uporabo oksidacijskega reagenta, spremenjenega z dodajanjem živosrebrovega (II) nitrata. Priporoča se, da se za oceno posamezne vrste vzorca, ki vsebuje klorid, uporabi največja dovoljena prostornina vzorca. Visoke koncentracije soli v vzorcu, analiziranem z metodo sežiganja, lahko povzročijo prekritje katalizatorja s soljo in čezmerno korozijo sežigalne cevi. V skladu z navodili proizvajalca je treba izvajati varnostne ukrepe.

Zelo motni vzorci in vzorci, ki vsebujejo delce, pri uporabi metode s persulfatom/ultravijoličnim obsedanjem morda ne bodo popolnoma oksidirali.

Primer ustrezne metode

Nehlapen organski ogljik se določi z oksidacijo s persulfatom/ultravijoličnim obsevanjem in nato kvantifikacijo sproščenega CO_2, pri čemer se uporabi nedisperzivna infrardeča spektrometrija.

Oksidacijski reagent se prilagodi v skladu s predlogi iz (2), kot je opisano v navodilih proizvajalca:

(a) 8,2 g $HgCl_2$ in 9 6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ se raztopi v več sto mililitrih vode z reagentom z nizko koncentracijo ogljika;

(b) 20 g $K_2S_2O_8$ se raztopi v raztopini živosrebrove soli;

▼**M6**

(c) zmesi se doda 5 ml HNO_3 (koncentracija);

(d) reagent se razredči na 1 000 ml.

Motnja, ki jo povzroči klorid, se prepreči s 40 µl vzorca za 10-odstotni klorid in 200 µl vzorca za 1,9-odstotni klorid. Vzorci visokih koncentracij klorida in/ali večje prostornine vzorcev se lahko analizirajo v skladu s to metodo, če se prepreči kopičenje klorida v oksidacijski posodi. Če je ustrezno, se nato lahko za zadevno vrsto vzorca določi hlapen organski ogljik.

LITERATURA

(1) ISO, Kakovost vode – Navodila za določanje skupnega organskega ogljika (TOC). Osnutek mednarodnega standarda ISO/DIS 8245, 16. januar, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16. izdaja, 1985.

Tudi aktualno (vsebuje opis sistema avtoanalize):

(3) Schreurs, W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137–142.

▼M6

Dodatek 2

Biološka razgradnja v morski vodi

METODA STRESANJA BUČKE

PODATKOVNI LIST

1. **LABORATORIJ:**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA:**

3. **PRESKUSNA SNOV:**

Naziv:

Koncentracija založne raztopine:	mg/l kot snov
Začetna koncentracija v mediju, t_o:	mg/l kot snov
	mg DOC/l

4. **MORSKA VODA:**

Vir:

Datum odvzema:

Globina odvzema:

Videz ob odvzemu (npr. moten itd.):

Slanost ob odvzemu:	‰
Temperatura ob odvzemu:	°C
DOC „x“ ur po odvzemu:	mg/l

Tretiranje pred preskusom (npr. filtriranje, sedimentacija, staranje itd.):

Število mikrobnih kolonij	— izvirni vzorec:	kolonije/ml
	— na začetku preskusa:	kolonije/ml

Druge značilnosti:

5. **DOLOČITVE OGLJIKA:**

Analizator ogljika:

	Št. bučke		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Preskus: morska voda s preskusno snovjo, okrepljena s hranilnimi snovmi	1	a_1					
		a_2					
		sredina, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		sredina, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Št. bučke		DOC po n dneh (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Slepi vzorec: morska voda brez preskusne snovi, okrepljena s hranilnimi snovmi	1	c_1					
		c_2					
		sredina, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		sredina, $C_{d(t)}$					
	sredina, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VREDNOTENJE NEOBDELANIH PODATKOV:**

Št. bučke	Izračun rezultatov	% razgradnje po n dneh				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Sredina (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Če je med D_1 in D_2 velika razlika, se srednja vrednost ne izračuna.

Opomba: Podobne oblike se lahko uporabijo, če razgradnji sledi specifična analiza ter za referenčne snovi in kontrole strupenosti.

7. **ABIOTSKA RAZGRADNJA (neobvezno)**

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentracija DOC (mg/l) v sterilnih kontrolah	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Dodatek 3

Izračun teoretične biokemijske potrebe po kisiku

METODA Z ZAPRTO STEKLENICO

Teoretična biokemijska potreba po kisiku snovi $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ molekulske mase MW se izračuna glede na:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Ta izračun pomeni, da se C mineralizira v CO_2, H v H_2O, P v P_2O_5 in Na v Na_2O. Halogen se izloči kot vodikov halid in dušik kot amoniak.

Primer:

glukoza $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 mg\ O_2/mg glucose$$

Molekulske mase soli, razen soli alkalnih kovin, se izračunajo ob predpostavki, da so bile soli hidrolizirane.

Predpostavlja se, da je žveplo oksidiralo na stopnjo + 6.

Primer:

natrijev n-dodecilbenzensulfonat$C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 mg\ O_2/mg substance$$

V primeru snovi, ki vsebujejo dušik, se lahko dušik izloči kot amoniak, nitrit ali nitrat, ki ustreza različnim teoretičnim potrebam po kisiku.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

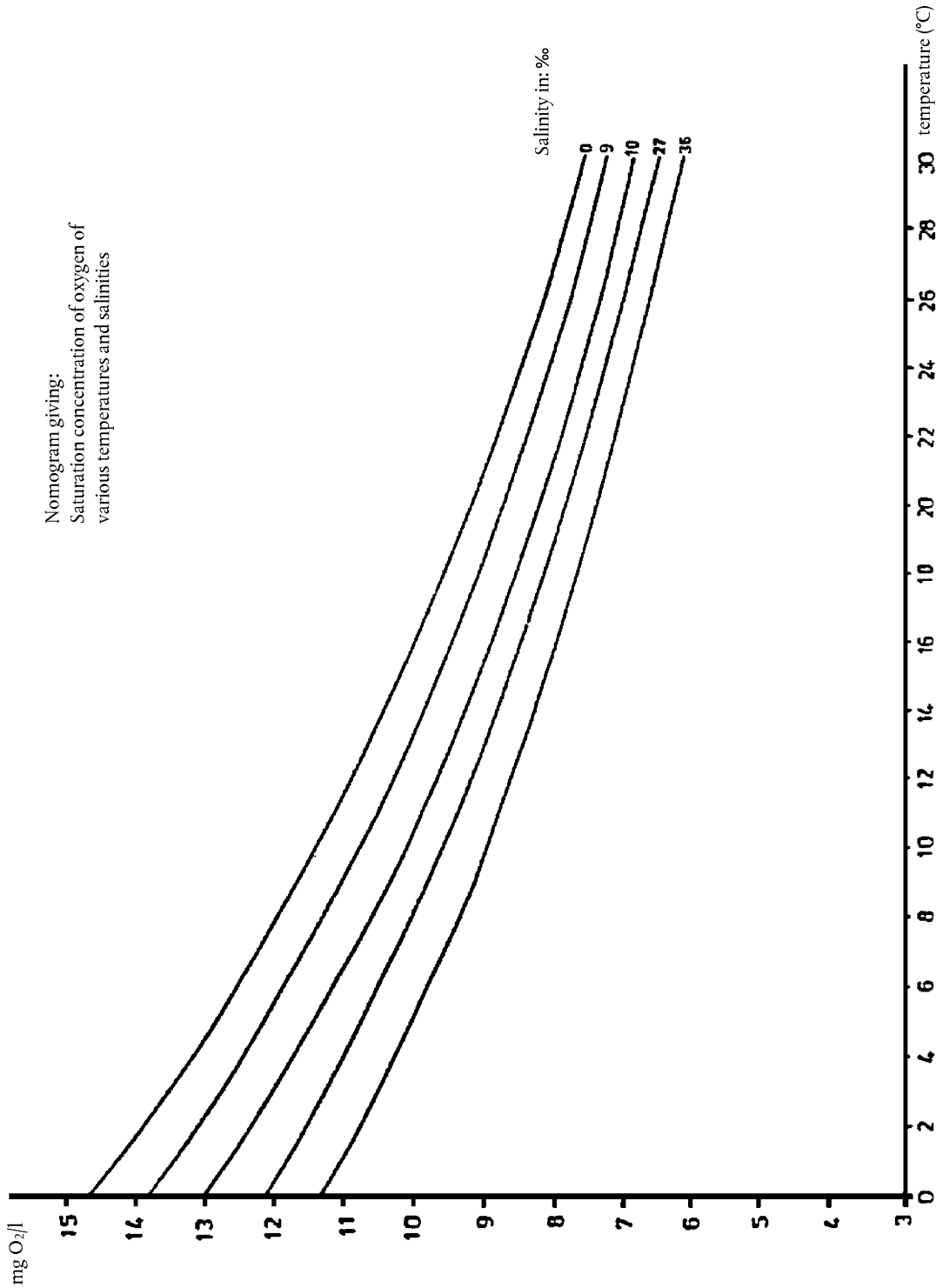
Če je bila v primeru sekundarnega amina z analizo opažena popolna tvorba nitrata:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 mg\ O_2/mg substance$$

▼**M6**

Dodatek 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
Salinity in: ‰
0
9
10
27
36
mg O2/l
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
temperature (°C)

▼M6

Dodatek 5

Biološka razgradnja v morski vodi

METODA Z ZAPRTO STEKLENICO

PODATKOVNI LIST

1. **LABORATORIJ:**

2. **DATUM ZAČETKA PRESKUSA:**

3. **PRESKUSNA SNOV:**

Naziv:

Koncentracija založne raztopine:	mg/l
Začetna koncentracija v mediju morske vode:	mg/l
TPK ali KPK:	mg O_2/mg preskusne snovi

4. **MORSKA VODA:**

Vir:

Datum odvzema:

Globina odvzema:

Videz ob odvzemu (npr. moten itd.):

Slanost ob odvzemu:	‰
Temperatura ob odvzemu:	°C
DOC „x“ ur po odvzemu:	mg/l

Tretiranje pred preskušanjem (npr. filtriranje, sedimentacija, staranje itd.):

Število mikrobnih kolonij	— izvirni vzorec:	kolonije/ml
	— na začetku preskusa:	kolonije/ml

Druge značilnosti:

5. **PRESKUSNI MEDIJ:**

Temperatura po prezračevanju:	°C
Koncentracija O_2 po prezračevanju in stanje pred začetkom preskusa:	mg O_2/l

6. **DOLOČANJE RAZTOPLJENEGA KISIKA:**

Metoda: Winkler/elektroda

	Št. bučke		mg O_2/l po n dneh			
			0	5	15	28
Preskus: morska voda, okrepljena s hranilnimi snovmi, s preskusno snovjo	1	a_1				
	2	a_2				
	sredina preskusnega vzorca	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Št. bučke		mg O_2/l po n dneh			
			0	5	15	28
Slepi vzorec: morska voda, okrepljena s hranilnimi snovmi, brez preskusne snovi	1	c_1				
	2	c_2				
	sredina slepega vzorca	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Opomba: za referenčno snov in kontrolo strupenosti se lahko uporabi podobna oblika.

7. **PORABA RAZTOPLJENEGA KISIKA: % RAZGRADNJE (% D):**

	Razgradnja DO po n dneh		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(^1)}{test\ substance(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Predpostavlja se, da $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, pri čemer je
$m_{b(o)}$ = vrednost slepega vzorca na dan 0,
$m_{t(o)}$ = vrednost preskusne snovi na dan 0.
Če $m_{b(o)}$ ni enako $m_{t(o)}$, se uporabi $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, pri čemer je
$m_{b(x)}$ = vrednost slepega vzorca na dan x,
$m_{t(x)}$ = vrednost preskusne snovi na dan x.

▼M6

C.43 **ANAEROBNA BIOLOŠKA RAZGRADLJIVOST ORGANSKIH SNOVI V PREGNITEM BLATU: Z MERJENJEM NASTAJANJA PLINA**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 311 (2006). Obstajajo številni presejalni preskusi za ocenjevanje aerobne biološke razgradljivosti organskih snovi (preskusne metode C.4, C.9, C.10 in C.11 (1) ter OECD TG 302C (2)), rezultati njihove uporabe pa so se uspešno uporabljali za napovedovanje končnega stanja snovi v aerobnem okolju, zlasti v aerobnih fazah čiščenja odpadne vode. Aerobno se obravnavajo tudi različni deli snovi, ki niso topne v vodi, ter snovi, ki se adsorbirajo na trdne delce odplak, ker so prisotni v usedenih odplakah. Vendar se večji kosi teh snovi vežejo na primarno usedene odplake, ki se ločijo od neobdelanih odplak v usedalniku, preden se usedene odplake ali odplake, zbrane na površju, aerobno očistijo. Odplake, ki v intersticijski vodi vsebujejo nekatere topne snovi, se nato prenesejo v ogrevana gnilišča za anaerobno čiščenje. Ker v tem sklopu še ni preskusov za ocenjevanje anaerobne biološke razgradljivosti v anaerobnih gniliščih in je ta preskus namenjen zapolnitvi te vrzeli, morda ni uporaben za druge anoksične ekosisteme.

2. Respirometrične tehnike za merjenje količin nastalega plina, zlasti metana (CH_4) in ogljikovega dioksida (CO_2), v anaerobnih pogojih, so se uspešno uporabljale za ocenjevanje anaerobne biološke razgradljivosti. Birch idr. (3) so pregledali te postopke in sklenili, da je delo Sheltona in Tiedjea (4), ki temelji na zgodnjih študijah (5) (6) (7), najpodrobnejše. Metoda (4), ki so jo naprej razvili drugi (8) in je postala ameriški standard (9) (10), ni rešila težav v zvezi z različno topnostjo CO_2 in CH_4 v preskusnem mediju ter izračunom teoretičnega nastanka plina preskusne snovi. V poročilu ECETOC (3) je bila priporočena dodatna meritev vsebnosti raztopljenega anorganskega ogljika (DIC) v supernatantu, zaradi česar je tehnika postala širše uporabna. Metoda ECETOC je bila mednarodno kalibrirana (oz. krožno preskušena) in je postala standard ISO 11734 (11).

3. Ta preskusna metoda, ki temelji na ISO 11734 (11), opisuje presejalno metodo za vrednotenje možne anaerobne biološke razgradljivosti organskih snovi v specifičnih pogojih (tj. v anaerobnem gnilišču v danem času in razponu koncentracije mikroorganizmov). Ker se razredčeno blato uporablja z razmeroma visoko koncentracijo preskusne snovi in preskus običajno traja dlje od retencijskega časa v anaerobnih gniliščih, preskusni pogoji morda niti ne ustrezajo pogojem v anaerobnih gniliščih niti niso uporabni za ocenjevanje anaerobne biološke razgradljivosti organskih snovi v različnih okoljskih pogojih. Blato je preskusni snovi izpostavljeno največ 60 dni, kar je dlje od običajnega retencijskega časa blata (25 do 30 dni) v anaerobnih gniliščih, čeprav so lahko retencijski časi na industrijskih lokacijah veliko daljši. Predvidevanja na podlagi rezultatov tega preskusa niso tako prepričljiva kot predvidevanja v primeru aerobne biološke razgradnje, ker so dokazi, pridobljeni o obnašanju preskusne snovi pri „lahkih“ aerobnih preskusih in simulacijskih preskusih ter v aerobnem okolju, dovolj prepričljivi, da obstaja povezava; za anaerobno okolje obstaja malo podobnih dokazov. Pojav popolne anaerobne biološke razgradnje se lahko predvidi, če se doseže 75–80 % teoretičnega nastanka plina. Velika razmerja snovi glede na

▼M6

biomaso, uporabljena v teh preskusih, pomenijo, da se bo snov, ki prehaja, verjetneje razgradila v anaerobnem gnilišču. Poleg tega se snovi, ki se v preskusu ne spremenijo v plin, morda ne bodo ohranile v okoljsko bolj realnih razmerjih med snovjo in biomaso. Pojavljajo se tudi druge anaerobne reakcije, s katerimi se lahko snovi vsaj delno razgradijo, npr. z dekloriranjem, vendar ta preskus ne zazna takih reakcij. Izginjanje preskusne snovi pa se lahko spremlja z uporabo specifičnih analitskih metod za njeno določanje (glej odstavke 6, 30, 44 in 53).

NAČELO PRESKUSA

4. Sprano pregnito blato ([1]), ki vsebuje nizke (< 10 mg/l) koncentracije anorganskega ogljika, se približno desetkrat razredči, da je koncentracija vseh snovi v trdnem stanju od 1 g/l do 3 g/l, in približno 60 dni inkubira pri 35 °C ± 2 °C v zatesnjenih posodah s preskusno snovjo pri 20 do 100 mg C/l. Aktivnost blata se meri z vzporedno slepo kontrolo z inokulumom blata v mediju in brez preskusne snovi.

5. Izmeri se naraščanje tlaka v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina zaradi nastajanja ogljikovega dioksida in metana. Večina nastalega CO_2 se bo v preskusnih pogojih raztopila v tekoči fazi ali spremenila v karbonat ali vodikov karbonat. Ta anorganski ogljik se izmeri na koncu preskusa.

6. Količina ogljika (anorganskega in metana), ki nastane zaradi biološke razgradnje preskusne snovi, se izračuna iz neto nastalega plina in neto tvorbe anorganskega ogljika v tekoči fazi nad vrednostmi slepe kontrole. Obseg biološke razgradnje se izračuna iz skupnega anorganskega ogljika in nastalega metana-C kot odstotek izmerjene ali izračunane količine ogljika, dodanega preskusni snovi. Potek biološke razgradnje se lahko sledi zgolj z vmesnimi meritvami nastajanja plina. Primarna biološka razgradnja se lahko določi še s specifično analizo na začetku in koncu preskusa.

INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

7. Za pravilno razlago rezultatov morajo biti znani čistost, vodotopnost, hlapnost in adsorpcijske lastnosti preskusne snovi. Vsebnost organskega ogljika (% m/m) preskusne snovi je treba določiti na podlagi njene kemijske strukture ali z meritvami. Pri hlapnih preskusnih snoveh k odločitvi o uporabnosti preskusa prispeva izmerjena ali izračunana Henryjeva konstanta. Informacije o strupenosti preskusne snovi za anaerobne bakterije so koristne pri izbiri ustrezne preskusne koncentracije in pri razlagi rezultatov, ki kažejo slabo biološko razgradljivost. Priporoča se vključitev nadzora zaviranja, razen če je znano, da preskusna snov ne zavira anaerobnih mikrobnih dejavnosti (glej odstavek 21 in ISO 13641-1 (12)).

([1]) Pregnito blato je zmes določenih faz odplak in aktivnega blata, ki so bili inkubirani v anaerobnem gnilišču pri približno 35 °C, da bi se zmanjšala biomasa in težave v zvezi z vonjem ter izboljšala sposobnost odplak za odstranjevanje vode. Vsebuje asociacijo anaerobnih fermentativnih in metanogenih bakterij, ki proizvajajo ogljikov dioksid in metan (11).

▼M6

UPORABNOST PRESKUSNE METODE

8. Preskusna metoda se lahko uporablja za vodotopne snovi; uporabi se lahko tudi za slabo topne in netopne snovi, če se uporabi metoda natančnega odmerjanja, npr. glej ISO 10634 (13). Na splošno je pri hlapnih snoveh potrebno odločanje na podlagi posameznega primera. Morda bo potrebno sprejeti posebne ukrepe, na primer zadrževanje plina med preskusom.

REFERENČNE SNOVI

9. Da se postopek preveri, se referenčna snov preskusi z določitvijo vzporednih ustreznih posod kot del običajnega poteka preskusa. Primeri so fenol, natrijev benzoat in polietilen glikol 400, pri čemer se pričakuje, da se bo v 60 dneh teoretični nastanek plina zmanjšal za več kot 60 % (npr. metan in anorganski ogljik) (3) (14).

OBNOVLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

10. Mednarodni krožni preskus (14) je dosegel dobro obnovljivost meritev tlaka plina med tremi posodami. Relativni standardni odklon (koeficient variacije, COV) je bil večinoma nižji od 20 %, čeprav se je ta vrednost ob prisotnosti strupenih snovi ali prosti koncu 60-dnevnega inkubacijskega obdobja pogosto povečala na > 20 %. Večji odkloni so bili ugotovljeni tudi v posodah s prostornino < 150 ml. Končne vrednosti pH preskusnega medija so bile v razponu 6,5–7,0.

11. S krožnim preskusom so bili pridobljeni naslednji rezultati.

Preskusna snov	Skupni podatki n_1	Srednja razgradnja (skupni podatki) (%)	Relativni standardni odklon (skupnih podatkov) (%)	Veljavni podatki n_2	Srednja razgradnja (veljavni podatki) (%)	Relativni standardni odklon (veljavni podatki) (%)	Podatki > 60 % razgradnja pri veljavnih preskusih n_3
Palmitinska kislina	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilen Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Delež n_2

12. Koeficienti variacije sredine vseh vrednosti, pridobljenih s palmitinsko kislino in polietilen glikolom 400, so bili 45 % (n = 36) oziroma 35 % (n = 38). Ko so se vrednosti < 40 % in > 100 % izpustile (prve domnevno zaradi neoptimalnih pogojev, druge iz neznanih razlogov), so se koeficienti variacije zmanjšali na 26 % oziroma 23 %. Deleža „veljavnih“ vrednosti, ki so zagotovile vsaj 60 odstotno razgradnjo, sta bila 70 % za palmitinsko kislino in 83 % za polietilen glikol 400. Deleži odstotka biološke razgradnje, izpeljani iz meritev raztopljenega anorganskega ogljika, so bili razmeroma majhni, vendar različni. Za palmitinsko kislino sta bila razpon 0–35 % in sredina 12 % s koeficientom variacije 92 %, za polietilen glikol 400 pa razpon 0–40 % in sredina 24 % s koeficientom variacije 54 %.

OPIS PRESKUSNE METODE

Oprema

13. Potrebna je običajna laboratorijska oprema in naslednje:

a. inkubator – zaščiten pred iskrami in z vzdrževano temperaturo 35 °C ± 2 °C,

▼M6

b. steklene preskusne posode, odporne proti tlaku, ustrezne nominalne velikosti ([1]), opremljene s plinotesnimi septumi, ki lahko vzdržijo približno 2 bara. Prostornina prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina mora biti približno od 10 % do 30 % celotne prostornine. Če se bioplin redno sprošča, je ustrezna približno 10-odstotna prostornina prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina, če pa se plin sprošča samo na koncu preskusa, je ustrezna 30-odstotna prostornina. Če se tlak sprošča ob vsakem vzorčenju, se priporočajo steklene serumske steklenice z nominalno prostornino 125 ml, skupno prostornino približno 160 ml, zatesnjene s serumskimi septumi ([2]) in aluminijastimi zapornimi obročki,

c. naprava za merjenje tlaka ([3]), prilagojena tako, da omogoča meritve in izpuščanje nastalega plina, na primer natančni ročni merilnik tlaka, povezan s primerno injekcijsko iglo; trojni plinotesni petelinček olajša sproščanje prevelikega tlaka (Dodatek 1). Notranjo prostornino cevi in ventila pretvornika tlaka je treba ohranjati čim manjšo, da so napake zaradi zanemarjanja prostornine opreme neznatne,

Opomba: meritve tlaka se uporabijo neposredno za izračun količine ogljika, nastalega v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (odstavki 42 do 44). Odčitki tlaka se lahko z grafom za pretvorbo pretvorijo tudi v prostornine (pri 35 °C in atmosferskem tlaku) nastalega plina. Ta graf sestavljajo podatki, ki se pridobijo z injiciranjem znanih prostornin dušikovega plina v niz preskusnih posod (npr. serumskih steklenic) pri 35 °C ± 2 °C in beleženjem poslediˇnih odčitkov stabiliziranega tlaka (glej Dodatek 2). Izračun je prikazan v opombi pri odstavku 44.

Opozorilo: pri uporabi mikrobrizg je treba paziti, da ne pride do poškodb z iglami.

d. analizator ogljika, primeren za neposredno določitev anorganskega ogljika v razponu od 1 mg/l do 200 mg/l,

e. zelo natančne brizge za plinaste in tekoče vzorce,

f. magnetna mešala in sledilniki (neobvezno),

g. komora, v katero posegamo z rokavicami (priporočeno).

Reagenti

14. Ves čas se uporabljajo analitsko čisti reagenti.

([1]) Priporočena velikost je 0,1 litra do 1 litra.

([2]) Priporoča se uporaba plinotesnih silikonskih septumov. Priporoča se še, da se preskusi plinotesnost pokrovčkov, zlasti septumov iz butilnega kavčuka, ker več komercialno dostopnih septumov ni primerno plinotesnih za metan, nekateri septumi pa ne ostanejo tesni, če se v preskusnih pogojih preluknjajo z iglo.

([3]) Napravo je treba uporabljati in kalibrirati po navodilih proizvajalca v rednih časovnih razmikih. Če se uporabi merilnik tlaka predpisane kakovosti, npr. kapsuliran z jekleno membrano, kalibracija v laboratoriju ni potrebna. Natančnost kalibracije se lahko preveri v laboratoriju z enotočkovno meritvijo pri 1×10^5 Pa z merilnikom tlaka z mehanskim prikazovalnikom. Če je ta točka pravilno izmerjena, se tudi linearnost ne bo spremenila. Če se uporabijo druge naprave za meritve (katerih kalibracije ni potrdil proizvajalec), se priporoča kalibracija celotnega razpona v rednih časovnih razmikih.

▼M6

Voda

15. Destilirana ali deionizirana voda (deoksigenirana s prezračevanjem z dušikovim plinom, ki vsebuje manj kot 5 µl/l kisika), ki vsebuje manj kot 2 mg/l raztopljenega organskega ogljika (DOC).

Preskusni medij

16. Medij za redčenje se pripravi tako, da vsebuje naslednje sestavine v navedenih količinah:

Brezvodni kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatrijev hidrogen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Amonijev klorid (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Železov (II) klorid tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (kazalnik kisika)	0,001 g
Natrijev sulfid nonahidrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Založna raztopina elementov v sledovih (neobvezno, odstavek 18)	10 ml
Doda se deoksigenirana voda (odstavek 15)	do 1 litra

Opomba: uporabiti je treba svež natrijev sulfid ali pa ga je treba pred uporabo sprati in posušiti, da se zagotovi zadostna sposobnost redukcije. Preskus bi se lahko izvedel brez uporabe komore, v katero posegamo z rokavicami (glej odstavek 26). V tem primeru je treba končno koncentracijo natrijevega sulfida v mediju povečati na 0,20 g Na2S · $9H_2O$ na liter. Natrijev sulfid se lahko doda tudi iz primerne anaerobne založne raztopine prek septuma zaprtih preskusnih posod, saj se s tem postopkom zmanjša tveganje oksidacije. Natrijev sulfid se lahko zamenja s titanovim (III) citratom, ki se doda skozi septum zaprtih preskusnih posod pri končni koncentraciji 0,8 do 1,0 mmol/l. Titanov (III) citrat je zelo učinkovit reducent nizke strupenosti, ki se pripravi, kot sledi: v 50 ml deoksigenirane vode se raztopi 2,94 g trinatrijevega citrata dihidrata (da dobimo raztopino 200 mmol/l) in doda 5 ml 15-odstotne (m/v) raztopine titanovega (III) klorida). Z mineralno alkalijo se nevtralizira do pH 7 ± 0,2 in odmeri v ustrezno posodo pod tokom dušika. Koncentracija titanovega (III) citrata v tej založni raztopini je 164 mmol/l.

17. Sestavine preskusnega medija, razen reducenta (natrijev sulfid titanov citrat), se premešajo, raztopina pa neposredno pred uporabo približno 20 minut prezračuje z dušikovim plinom, da se odstrani kisik. Nato se neposredno pred uporabo medija doda primerna prostornina sveže pripravljene raztopine reducenta (pripravljene v deoksigenirani vodi). Po potrebi se pH medija prilagodi z razredčeno mineralno kislino ali bazo na pH 7 ± 0,2.

▼M6

Založna raztopina elementov v sledovih

18. Da se izboljšajo procesi anaerobne razgradnje, zlasti če se uporabljajo nizke koncentracije (npr. 1 g/l) inokuluma, se priporoča, da preskusni medij vsebuje naslednje elemente v sledovih (11).

Manganov klorid tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Borova kislina (H_3BO_3)	5 mg
Cinkov klorid ($ZnCl_2$)	5 mg
Bakrov (II) klorid ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatrijev molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobaltov klorid heksahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikljev klorid heksahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatrijev selenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Doda se deoksigenirana voda (odstavek 15)	do 1 litra

Preskusna snov

19. Preskusna snov se doda kot založna raztopina, suspenzija, emulzija ali neposredno kot trdna snov ali tekočina ali kot absorbirana na filter iz steklenih vlaken, da se dobi koncentracija največ 100 mg/l organskega ogljika. Če se uporabijo založne raztopine, se pripravi primerna raztopina z vodo (odstavek 15) (predhodno deoksigenirana s prezračevanjem z dušikovim plinom) take moči, da je dodana prostornina manj kot 5 % skupne prostornine reakcijske zmesi. Po potrebi se pH založne raztopine prilagodi na pH 7 ± 0,2. Za preskusne snovi, ki v vodi niso dovolj topne, glej ISO 10634 (13). V primeru uporabe topila se pripravi dodatna kontrola, pri čemer se topilo doda le v inokulirani medij. Izogibati se je treba organskim topilom, za katera je znano, da zavirajo nastajanje metana, kot sta kloroform in ogljikov tetraklorid.

Opozorilo: s strupenimi preskusnimi snovmi in snovmi, katerih lastnosti niso znane, je treba ravnati previdno.

Referenčne snovi

20. Referenčne snovi, kot so natrijev benzoat, fenol in polietilen glikol 400, so se uspešno uporabljale za preverjanje postopka, pri čemer so se v 60 dneh več kot 60-odstotno razgradile. Založna raztopina (v deoksigenirani vodi) izbrane referenčne snovi se pripravi enako kot za preskusno snov, njen pH pa se po potrebi uravna na 7 ± 0,2.

Kontrola zaviranja (pogojno)

21. Za pridobivanje informacij o strupenosti preskusne snovi za anaerobne mikroorganizme, da se ugotovi najprimernejša preskusna koncentracija, se preskusna snov in referenčna snov vneseta v posodo s preskusnim medijem (glej odstavek 16), in sicer vsaka v enaki koncentraciji, kot je bila dodana (glej odstavka 19 in 20 ter ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Pregnito blato

22. Pregnito blato se odvzame iz gnilišča v čistilni napravi odpadnih vod, ki čisti predvsem gospodinjske odplake. Opisati je treba vse značilnosti blata in sporočiti informacije o njegovem ozadju (glej odstavek 54). Če naj bi se uporabil prilagojeni inokulum, se lahko prouči uporaba pregnitega blata iz industrijske čistilne naprave. Za odvzem pregnitega blata se uporabijo plastenke s širokim grlom iz polietilena visoke gostote ali podobnega materiala, ki se lahko razširi. Plastenke se napolnijo z blatom do 1 cm pod vrhom in zatesnijo, po možnosti z varnostnim ventilom. Odvzeto blato se lahko po prevozu v laboratorij uporabi neposredno ali pa se postavi v laboratorijsko gnilišče. Odvečni bioplin se sprosti s previdnim odpiranjem plastenk z blatom. Kot vir inokuluma se lahko uporabi tudi laboratorijsko pridelano anaerobno blato, vendar je lahko njegov razpon delovanja zmanjšan.

Opozorilo: pregnito blato proizvaja vnetljive pline, ki predstavljajo tveganje požara ali eksplozije; vsebuje tudi potencialno patogene organizme, zato je treba pri ravnanju z njim upoštevati ustrezne varnostne ukrepe. Iz varnostnih razlogov se za odvzem blata ne uporabljajo steklene posode.

23. Da se zmanjšata nastajanje plina v ozadju in vpliv slepih kontrol, se lahko prouči predhodno gnitje blata. Če je predhodno gnitje potrebno, se mora blatu omogočiti gnitje brez dodajanja hranilnih snovi ali substratov pri 35 °C ± 2 °C do 7 dni. Ugotovljeno je bilo, da se s približno petdnevnim predhodnim gnitjem običajno optimalno zmanjša nastajanje plina v slepih vzorcih, ne da bi se nesprejemljivo povečala lag faza ali inkubacijsko obdobje v preskusni fazi ali ne da bi prišlo do nedejavnosti majhnega števila preskušanih snovi.

24. Za preskusne snovi, ki so slabo biološko razgradljive ali so domnevno slabo biološko razgradljive, se prouči predhodna izpostavljenost blata preskusni snovi, da se pridobi inokulum, ki je bolje prilagojen. V takem primeru se preskusna snov doda pregnitemu blatu v koncentraciji organskega ogljika, ki je od 5 mg/l do 20 mg/l, in inkubira največ dva tedna. Predhodno izpostavljena snov se pred uporabo previdno spere (glej odstavek 25), v poročilu o preskusu pa se navedejo pogoji predhodne izpostavljenosti.

Inokulum

25. Blato se spere (glej odstavke 22 do 24) neposredno pred uporabo, da se koncentracija anorganskega ogljika v končni preskusni suspenziji zmanjša na manj kot 10 mg/l. Blato se centrifugira v zatesnjenih centrifugirnih epruvetah (npr. 3 000 g 5 minut) in izpusti supernatant. Dobljeni peleti se suspendirajo v deoksigeniranem mediju (odstavka 16 in 17), suspenzija se ponovno centrifugira, supernatant pa se izpusti. Če se količina anorganskega ogljika ni dovolj zmanjšala, se lahko postopek spiranja blata ponovi največ dvakrat. To naj ne bi škodljivo vplivalo na mikroorganizme. Na koncu se pelet suspendira v potrebni prostornini preskusnega medija in določi koncentracija vseh snovi v trdnem stanju [npr. ISO 11923 (15)]. Končna koncentracija vseh snovi v trdnem stanju v preskusnih posodah mora biti v razponu od 1 g/l do 3 g/l (ali približno 10 % koncentracije v nerazredčenem pregnitem blatu). Zgornji postopki se izvedejo tako, da je blato v čim manjšem stiku s kisikom (uporabi se na primer dušikova atmosfera).

▼M6

PRESKUSNI POSTOPEK

26. Naslednji začetni postopki se izvedejo s tehnikami, ki vzdržujejo čim manjši stik med pregnitim blatom in kisikom, npr. morda bo potrebno delo v komori, v katero posegamo z rokavicami, v dušikovi atmosferi in/ali s spiranjem plastenk z dušikom (4).

Priprava preskusa s preskusnim vzorcem in kontrolo

27. Pripravijo se vsaj tri preskusne posode (glej odstavek 13-b) za preskusno snov, slepe kontrole, referenčne snovi, kontrole zaviranja (pogojno) in komore za kontrolo tlaka (neobvezen postopek) (glej odstavke 7 in 19–21). Pripravijo se lahko tudi dodatne posode za ocenjevanje primarne biološke razgradnje s specifičnimi analizami preskusne snovi. Isti niz slepih kontrol se lahko uporabi za več preskusnih snovi v istem preskusu, če so prostornine prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina skladne.

28. Razredčeni inokulum se pred vnosom v posode pripravi npr. s široko pipeto. Alikvoti dobro premešanega inokuluma (odstavek 25) se dodajo tako, da je koncentracija vseh snovi v trdnem stanju enaka v vseh posodah (med 1 g/l in 3 g/l). Po potrebi se založne raztopine preskusne in referenčne snovi dodajo po uravnavanju pH na 7 ± 0,2. Preskusno snov in referenčno snov je treba dodati na najprimernejši način (odstavek 19).

29. Preskusna koncentracija organskega ogljika mora biti običajno med 20 in 100 mg/l (odstavek 4). Če je preskusna snov strupena, je treba preskusno koncentracijo zmanjšati na 20 mg C/l ali celo manj, če je treba izmeriti le primarno biološko razgradnjo s specifičnimi analizami. Opozoriti je treba, da se variabilnost rezultatov preskusa poveča pri nižjih preskusnih koncentracijah.

30. V posode s slepimi vzorci se doda enaka količina nosilca, kot se uporabi za odmerjanje preskusne snovi, namesto založne raztopine, suspenzije ali emulzije. Če je bila preskusna snov dodana s filtri iz steklenih vlaken ali organskimi topili, se v slepe vzorce doda filter ali toliko topila, kot ga je izhlapelo. Za merjene vrednosti pH se pripravi dodatna ponovitev s preskusno snovjo. Po potrebi se pH uravna na 7 ± 0,2 z majhnimi količinami razredčene mineralne kisline ali baze. V vse preskusne posode je treba dodati enake količine nevtralizacijskega sredstva. Sredstva ni treba dodati, če je bila vrednost pH založnih raztopin preskusne snovi in referenčne snovi že prilagojena (glej odstavka 19 in 20). Če je treba izmeriti primarno biološko razgradnjo, je treba iz posode za kontrolo pH ali iz dodatne preskusne posode odvzeti primeren vzorec, koncentracijo preskusne snovi pa je treba izmeriti s specifičnimi analizami. Če je treba reakcijske zmesi premešati, se lahko v posode dodajo prekriti magneti.

31. Zagotoviti je treba, da sta skupna prostornina tekočine V_l in prostornina prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina V_h enaki v vseh posodah. Vrednosti V_l in V_h se zabeležita. Vse posode je treba zatesniti s plinskim septumom in jih iz komore, v katero posegamo z rokavicami (glej odstavek 26), prenesti v inkubator (glej odstavek 13-a).

▼M6

Netopne preskusne snovi

32. Stehtane količine snovi, ki so slabo topne v vodi, se dodajo neposredno v pripravljene posode. Če je uporaba topila potrebna (glej odstavek 19), se raztopina preskusne snovi ali suspenzije prenese v prazno posodo. Če je mogoče, naj topilo izhlapi s prehajanjem dušikovega plina skozi posode, nato pa se dodajo druge sestavine, tj. razredčeno blato (odstavek 25) in deoksigenirana voda, kot je potrebno. Pripraviti je treba tudi dodatno kontrolo s topilom (glej odstavek 19). Druge metode dodajanja netopnih snovi so opisane v ISO 10634 (13). Tekoče preskusne snovi se lahko z brizgo odmerijo v popolnoma pripravljene zatesnjene posode, če se pričakuje, da začetni pH ne bo presegel 7 ± 1, sicer pa se odmerijo, kot je opisano zgoraj (glej odstavek 19).

Inkubacije in meritve tlaka plina

33. Pripravljene posode se približno eno uro inkubirajo pri 35 °C ± 2 °C, da se omogoči uravnoteženje in sproščanje odvečnega plina v atmosfero, na primer s stresanjem posamezne posode, vstavitvijo igle merilnika tlaka (odstavek 13-c) skozi tesnilo in odpiranjem ventila, dokler se na merilniku tlaka ne prikaže vrednost nič. Če je v tej fazi ali ob vmesnih meritvah tlak prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina manjši od atmosferskega, je treba z dušikovim plinov ponovno vzpostaviti atmosferski tlak. Ventil se zapre (glej odstavek 13-c), inkubacija pa se nadaljuje v temi, pri čemer se zagotovi, da se vsi deli posode ohranjajo pri temperaturi za gnitje. Posode se po inkubaciji opazujejo od 24 do 48 ur. Če je supernatant v posodah izrazito rožnato obarvan, se zavržejo, tj. če je resazurin (glej odstavek 16) spremenil barvo, kar kaže na prisotnost kisika (glej odstavek 50). Čeprav lahko sistem majhne količine kisika zanemari, lahko višje koncentracije resno zavirajo potek anaerobne biološke razgradnje. Občasna zavrnitev posamezne posode iz niza treh je lahko sprejemljiva, vendar je treba pri večjem številu napak uvesti preiskavo eksperimentalnih postopkov in preskus ponoviti.

34. Vsebina vseh posod se previdno zmeša z nekajminutnim mešanjem ali stresanjem vsaj dvakrat ali trikrat na teden in neposredno pred vsakim merjenjem tlaka. S stresanjem se inokulum ponovno suspendira, pri čemer se zagotovi plinsko ravnotežje. Vse meritve tlaka je treba izvesti hitro, saj bi se lahko temperatura v preskusnih posodah znižala, kar bi povzročilo napačne meritve. Med merjenjem tlaka je treba v preskusnih posodah, vključno s prostorom v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina, vzdrževati temperaturo za gnitje. Tlak plina se izmeri na primer tako, da se skozi septum vstavi injekcijska igla (odstavek 13-c), priključena na merilnik za spremljanje tlaka. Paziti je treba, da voda ne vstopi v injekcijsko iglo. Če se to zgodi, je treba mokre dele osušiti in namestiti novo iglo. Tlak je treba meriti v milibarih (glej odstavek 42). Tlak plina v posodah se lahko izmeri v rednih časovnih presledkih, na primer vsak teden, odvečni plin pa se lahko sprosti v atmosfero. Namesto tega se lahko tlak izmeri le na koncu preskusa, da se določi količina nastalega bioplina.

35. Priporoča se, da se izvedejo vmesne meritve tlaka, saj se na podlagi povečanega tlaka določi, kdaj se lahko preskus prekine, pri čemer se lahko upošteva tudi kinetika (glej odstavek 6).

▼M6

36. Običajno se preskus konča po 60-dnevnem inkubacijskem obdobju, razen če krivulja biološke razgradnje, dobljena na podlagi meritev tlaka, prej doseže ravnotežje, tj. fazo, v kateri je bila dosežena največja razgradnja, krivulja biološke razgradnje pa se je zravnala. Če je vrednost ravnotežja manj kot 60 %, je razlaga otežena, ker kaže, da se je mineraliziral le del molekule ali da je prišlo do napake. Če ob koncu običajnega inkubacijskega obdobja plin nastaja, vendar ravnotežje očitno ni doseženo, je treba proučiti podaljšanje preskusa, da se preveri, ali bo ravnotežje (> 60 %) doseženo.

Merjenje anorganskega ogljika

37. Ob koncu preskusa po zadnji meritvi tlaka plina naj se blato usede. Posamezne posode se zaporedno odprejo in iz njih se nemudoma odvzame vzorec za določitev koncentracije (mg/l) anorganskega ogljika v supernatantu. Za supernatant se ne uporabi niti centrifugiranje niti filtriranje, ker bi prišlo do nesprejemljive izgube raztopljenega ogljikovega dioksida. Če supernatanta po vzorčenju ni mogoče analizirati, se za največ 2 dni shrani v zatesnjeni fioli brez prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina in ohlajen na približno 4 °C. Po merjenju anorganskega ogljika se izmeri in zabeleži vrednost pH.

38. Namesto tega se lahko anorganski ogljik v supernatantu določi posredno s sproščanjem raztopljenega anorganskega ogljika kot ogljikovega dioksida, ki se lahko izmeri v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina. Po zadnjem merjenju tlaka plina se tlak v vseh posodah uravna na atmosferski tlak. Vsebina posod se zakisa na približno pH 1, tako da se skozi septum zatesnjenih posod doda koncentrirana mineralna kislina (npr. H_2SO_4). Pretresene posode se približno 24 ur inkubirajo pri 35 °C ± 2 °C, tlak plina, ki nastane iz sproščenega ogljikovega dioksida, pa se izmeri z merilnikom tlaka.

39. Podobne meritve se izvedejo za ustrezne slepe vzorce, referenčne snovi in posode za kontrolo zaviranja, če so vključene (glej odstavek 21).

40. V nekaterih primerih, zlasti če se iste kontrolne posode uporabijo za več preskusnih snovi, je treba proučiti meritve vmesnih koncentracij anorganskega ogljika v preskusnih in kontrolnih posodah, kot je primerno. V tem primeru je treba pripraviti dovolj posod za vse vmesne meritve. Ta postopek ima prednost pred odvzemom vzorcev zgolj iz ene posode. Slednje se lahko izvede le, če se zdi, da potrebna prostornina za analizo raztopljenega anorganskega ogljika ni prevelika. Meritev raztopljenega anorganskega ogljika je treba izvesti po meritvi tlaka plina brez sproščanja odvečnega plina, kot je opisano v nadaljevanju:

— skozi septum se brez odpiranja posod z brizgo odvzame čim manjša prostornina vzorcev supernatanta, pri čemer se določi anorganski ogljik v vzorcu,

— po odvzemu vzorca se odvečni plin sprosti ali ne,

— upoštevati je treba, da lahko še tako majhno zmanjšanje prostornine supernatanta (npr. približno 1 %) pomeni znatno povečanje prostornine plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (V_h),

— enačbe (glej odstavek 44) se popravijo z vstavitvijo V_h v enačbo 3, kot je potrebno.

▼M6

Specifične analize

41. Če je treba določiti primarno anaerobno razgradnjo (glej odstavek 30), se iz posod, ki vsebujejo preskusno snov, na začetku in na koncu preskusa odvzame primerna prostornina vzorca za specifične analize. Če se to izvede, je treba pri izračunu rezultatov nastajanja plina upoštevati, da se bosta prostornini prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (V_h) in tekočine (V_l) spremenili. Namesto tega se lahko vzorci za specifične analize odvzamejo iz dodatnih zmesi, ki so bile predhodno določene za ta namen (odstavek 30).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

42. Iz praktičnih razlogov se tlak plina meri v milibarih (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa, 1 Pa = 1 N/m^2), prostornina v litrih in temperatura v stopinjah Celzija.

Ogljik v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina

43. Ker tako 1 mol metana kot 1 mol ogljikovega dioksida vsebuje 12 g ogljika, se lahko masa ogljika v dani prostornini sproščenega plina izrazi kot:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{enačba [1],}$$

pri čemer je:

m = masa ogljika (mg) v dani prostornini sproščenega plina,

12 = relativna atomska masa ogljika,

n = število molov plina v dani prostornini.

Če plin, ki ni metan ali ogljikov dioksid (npr. N_2O), nastane v znatnih količinah, je treba enačbo [1] spremeniti, da opisuje možnost učinkov nastalih plinov.

44. Na podlagi zakona plina se lahko n izrazi kot:

$$n = \frac{pV}{RT} \qquad \text{enačba [2]}$$

pri čemer je:

p = tlak plina (paskali),

V = prostornina plina (m^3),

R = plinska konstanta [8 314 J/(mol K)],

T = inkubacijska temperatura (kelvini).

S kombinacijo enačb [1] in [2] ter racionalizacijo za omogočanje nastajanja plina v slepih kontrolah.

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \qquad \text{enačba [3]}$$

pri čemer je:

m_h = masa neto ogljika, ki nastane kot plin v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (mg),

Dp = sredina razlike med začetnim in končnim tlakom v preskusni posodi, od katere se odšteje ustrezna sredina v slepih posodah (milibari),

▼M6

V_h = prostornina prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina v posodi (l),

0,1 = pretvorba za newtone/m^2 v milibare in m^3 v litre.

Enačbo [4] je treba uporabiti za normalno inkubacijsko temperaturo, ki je 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{enačba [4]}$$

Opomba: nadomestni izračun prostornine. Odčitki merilnika tlaka se pretvorijo v ml nastalega plina z umeritveno krivuljo, dobljeno z grafičnim prikazom injicirane prostornine (ml) glede na odčitke merilnika (Dodatek 2). Število molov (n) plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina se izračuna z deljenjem skupne količine nastalega plina (ml) s 25 286 ml/mol, kar je prostornina, ki jo zasede en mol plina pri 35 °C in standardnem atmosferskem tlaku. Ker tako 1 mol CH_4 kot 1 mol CO_2 vsebuje 12 g ogljika, se količina ogljika (mg) v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (m_h) izračuna z enačbo [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{enačba [5]}$$

Racionalizacija za omogočanje nastajanja plina v slepih kontrolah:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{enačba [6]}$$

pri čemer je:

m_h = masa neto ogljika, ki nastane kot plin v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (mg),

DV = sredina razlike med prostornino nastalega plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina v preskusnih posodah in posodah s slepimi kontrolami,

25286 = prostornina, ki jo zasede 1 mol plina pri 35 °C in 1 atmosferi.

45. Potek biološke razgradnje se lahko sledi z grafičnim prikazom povečanja skupnega tlaka Dp (milibari) v odvisnosti od časa, če je primerno. Na podlagi te krivulje se določi in zabeleži lag faza (dnevi). Lag faza je čas od začetka preskusa do začetka znatne razgradnje (glej na primer Dodatek 3). Če so bili odvzeti in analizirani vmesni vzorci supernatanta (glej odstavke 40, 46 in 47), se lahko namesto kumulativnega tlaka grafično prikaže skupni nastali ogljik (v plinu in tekočini).

Ogljik v tekočini

46. Količina metana v tekočini se zanemari, ker je znano, da je zelo slabo topen v vodi. Masa anorganskega ogljika v tekočini preskusne posode se izračuna z enačbo [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{enačba [7]}$$

pri čemer je:

m_l = masa anorganskega ogljika v tekočini (mg),

C_{net} = koncentracija anorganskega ogljika v preskusnih posodah, od katere se odšteje koncentracija v kontrolnih posodah na koncu preskusa (mg/l),

V_l = prostornina tekočine v posodi (l).

▼M6

Skupni uplinjeni ogljik

47. Skupna masa uplinjenega ogljika v posodi se izračuna z enačbo [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{enačba [8]}$$

pri čemer je:

m_t = skupna masa uplinjenega ogljika (mg),

m_h in m_l sta enaka zgornjim opredelitvam.

Ogljik preskusne snovi

48. Masa ogljika v preskusnih posodah, ki izhaja iz dodane preskusne snovi, se izračuna z enačbo [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{enačba [9]}$$

pri čemer je:

m_v = masa ogljika preskusne snovi (mg),

C_c = koncentracija ogljika preskusne snovi v preskusni posodi (mg/l),

V_l = prostornina tekočine v preskusni posodi (l).

Obseg biološke razgradnje

49. Odstotek biološke razgradnje se iz plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina izračuna z enačbo [10], skupni odstotek biološke razgradnje pa z enačbo [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{enačba [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{enačba [11]}$$

pri čemer je:

D_h = biološka razgradnja iz plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (%),

D_t = skupna biološka razgradnja (%),

m_h m_v in m_t so enaki zgornjim opredelitvam.

Stopnja primarne biološke razgradnje se izračuna iz (neobveznih) meritev koncentracije preskusne snovi na začetku in koncu inkubacije z enačbo [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{enačba [12]}$$

pri čemer je:

D_p = primarna razgradnja preskusne snovi (%),

S_i = začetna koncentracija preskusne snovi (mg/l),

S_e = koncentracija preskusne snovi na koncu (mg/l).

Če metoda analize kaže znatne koncentracije preskusne snovi v neprilagojenem inokulumu anaerobnega blata, se uporabi enačba [13]:

▼M6

$$D_p^{\ 1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{enačba [13]}$$

pri čemer je:

$D_p^{\ 1}$ = popravljena primarna razgradnja preskusne snovi (%),

S_{ib} = začetna „očitna“ koncentracija preskusne snovi v slepih kontrolah (mg/l),

S_{eb} = „očitna“ koncentracija preskusne snovi v slepih kontrolah na koncu (mg/l).

Veljavnost rezultatov

50. Uporabijo se lahko samo odčitki tlaka v posodah, ki ne kažejo rožnate obarvanosti (glej odstavek 33). Onesnaženje s kisikom se najbolj zmanjša z uporabo ustreznih tehnik za anaerobno ravnanje.

51. Upoštevati je treba, da je preskus veljaven, če referenčna snov doseže ravnotežje, ki predstavlja več kot 60-odstotno biološko razgradnjo ([1]).

52. Če pH na koncu preskusa preseže razpon 7 ± 1 in biološka razgradnja ni zadostna, se preskus ponovi z večjo puferno kapaciteto medija.

Zaviranje razgradnje

53. Nastajanje plina v posodah, ki vsebujejo preskusno snov in referenčno snov, mora biti vsaj enako nastajanju plina v posodah, ki vsebujejo samo referenčno snov, v nasprotnem primeru se kaže zaviranje nastajanja plina. V nekaterih primerih bo v posodah, ki vsebujejo preskusno snov brez referenčne snovi, nastalo manj plina kot v slepih kontrolah, kar kaže, da preskusna snov deluje kot inhibitor.

Poročilo o preskusu

54. V poročilo o preskusu se vključijo naslednje informacije:

Preskusna snov:

— splošno ime, kemijsko ime, številka CAS, strukturna formula in pomembne fizikalno-kemijske lastnosti,

— čistost (nečistoče) preskusne snovi.

Preskusni pogoji:

— prostornine razredčene tekočine gnilišča (V_l) in prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina v posodi,

— opis preskusnih posod, glavne značilnosti meritve bioplina (npr. vrsta merilnika tlaka) in analizatorja anorganskega ogljika,

— vnos preskusne snovi in referenčne snovi v preskusni sistem: uporabljena preskusna koncentracija in uporaba topil,

— podrobnosti o uporabljenem inokulumu: naziv čistilne naprave, opis vira prečiščene odpadne vode (npr. obratovalna temperatura, retencijski čas blata, predvsem gospodinjski itd.), koncentracija, vse informacije, potrebne za utemeljitev tega, in informacije o vseh predhodnih tretiranjih inokuluma (npr. predhodno gnitje, predhodna izpostavljenost),

— inkubacijska temperatura,

— število ponovitev.

([1]) To je treba ponovno oceniti, če so vključene adsorpcijske in netopne referenčne kemikalije.

▼M6

Rezultati:

— vrednosti pH in anorganskega ogljika na koncu preskusa,

— koncentracija preskusne snovi na začetku in koncu preskusa, če je bila izvedena specifična meritev,

— vsi izmerjeni podatki, zbrani v preskusu, slepe posode, posode z referenčno snovjo in posode za kontrolo zaviranja, kot je ustrezno (npr. tlak v milibarih, koncentracija anorganskega ogljika (mg/l) v obliki tabele (izmerjene podatke za prostor v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina in tekočino je treba sporočiti ločeno),

— statistična obdelava podatkov, trajanje preskusa ter diagram biološke razgradnje preskusne snovi, referenčne snovi in kontrole strupenosti,

— odstotek biološke razgradnje preskusne snovi in referenčne snovi,

— razlogi za morebitno zavrnitev rezultatov preskusa,

— razprava o rezultatih.

LITERATURA

(1) Naslednja poglavja te priloge:

C.4 Določanje „dobre“ biorazgradljivosti;

C.9 Biorazgradnja – Zahn-Wellensev preskus;

C.10 Simulacijski preskus za aerobno čiščenje odpadne vode:

A: Enote z aktivnim blatom, B: Biofilmi;

C.11 Biorazgradnja – preskus zaviranja dihanja aktivnega blata.

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Pariz.

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., in Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527– 1550. (Objavljeno tudi kot ECETOC Technical Report No. 28, junij 1988).

(4) Shelton D. R., in Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850–857.

(5) Owen, W. F., Stuckey, DC., Healy J. B., Jr, Young L. Y., in McCarty, P. L. (1979). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485–492.

(6) Healy, J. B. Jr., in Young, L. Y. (1979). Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84–89.

(7) Gledhill, W. E. (1979). Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Filadelfija.

(8) Battersby, N. S., in Wilson, V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441–2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Filadelfija.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1995) ISO 11 734 Kakovost vode – Vrednotenje „končne“ anaerobne biorazgradljivosti organskih spojin v presnovljenem blatu – Metoda z merjenjem nastalega bioplina.

(12) Mednarodna organizacija za standardizacijo (2003) ISO 13 641-1 Kakovost vode – Določevanje zaviranja nastanka plina, ki ga proizvedejo anaerobne bakterije – 1. del: Splošen preskus.

(13) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1995) ISO 10 634 Kakovost vode – Navodilo za pripravo in obdelavo v vodi slabo topnih organskih spojin za nadaljnje vrednotenje njihove biorazgradljivosti v vodi.

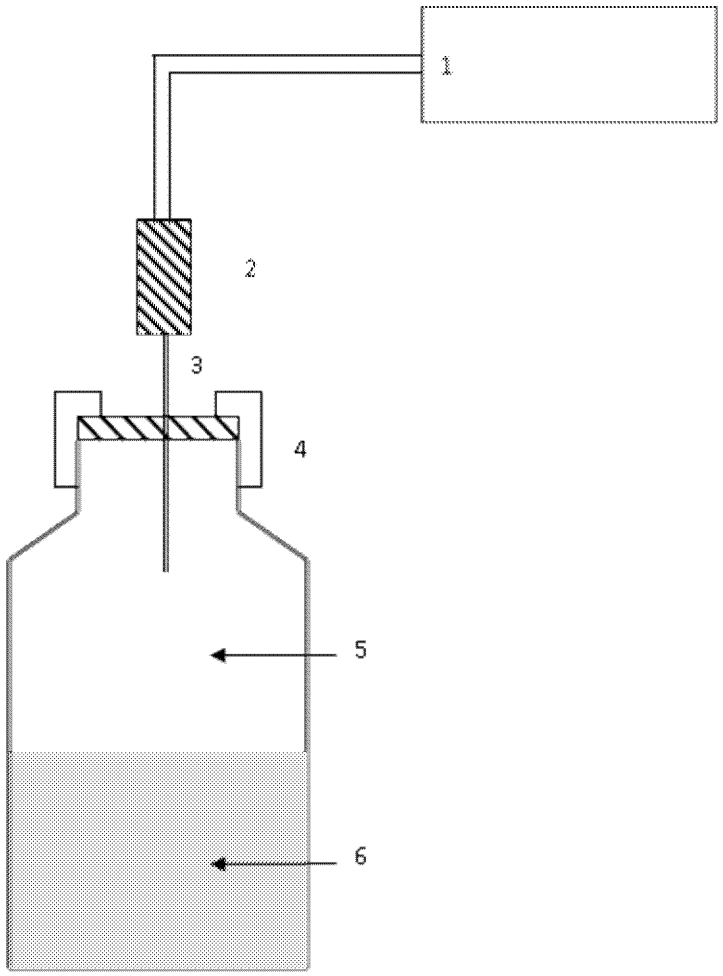
(14) Pagga, U., in Beimborn, D. B., (1993). Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499– 1509.

(15) Mednarodna organizacija za standardizacijo (1997) ISO 11 923 Kakovost vode – Določevanje suspendiranih snovi s filtracijo skozi filter iz steklenih vlaken.

▼**M6**

Dodatek 1

Primer opreme za merjenje nastajanja bioplina s tlakom plina



Legenda:

1 – Merilnik tlaka

2 – Trojni plinotesni petelinček

3 – Injekcijska igla

4 – Plinotesno tesnilo (zaporni pokrovček in septum)

5 – Prostor v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (V_h)

6 – Inokulum pregnitega blata (V_l)

Preskusne posode v okolju s 35 °C ± 2 °C

▼M6

Dodatek 2

Pretvorba odčitkov merilnika tlaka

Odčitki merilnika tlaka so lahko povezani s prostorninami plina z umeritveno krivuljo, ki nastane z injiciranjem znanih prostornin zraka pri 35 °C ± 2 °C v serumske steklenice, ki vsebujejo toliko vode kot reakcijska zmes, V_R:

— odmeri se V_R ml alikvotov vode in hrani v petih serumskih steklenicah pri 35 °C ± 2 °C. Steklenice se zatesnijo in za eno uro postavijo v vodno kopel pri 35 °C, da se vzpostavi ravnotežje,

— merilnik tlaka se vklopi, pusti, da se stabilizira, in nastavi na nič,

— injekcijska igla se vstavi skozi tesnilo ene od steklenic, ventil se odpre, dokler se na merilniku tlaka ne prikaže vrednost nič, in nato zapre,

— postopek se ponovi pri ostalih steklenicah,

— v vsako steklenico se injicira 1 ml zraka pri 35 °C ± 2 °C. Igla (merilnika) se vstavi skozi tesnilo eno od steklenic in pusti, da se meritve tlaka stabilizirajo. Tlak se zabeleži, ventil pa se odpre, dokler se na merilniku tlaka ne prikaže vrednost nič, in nato zapre,

— postopek se ponovi pri ostalih steklenicah,

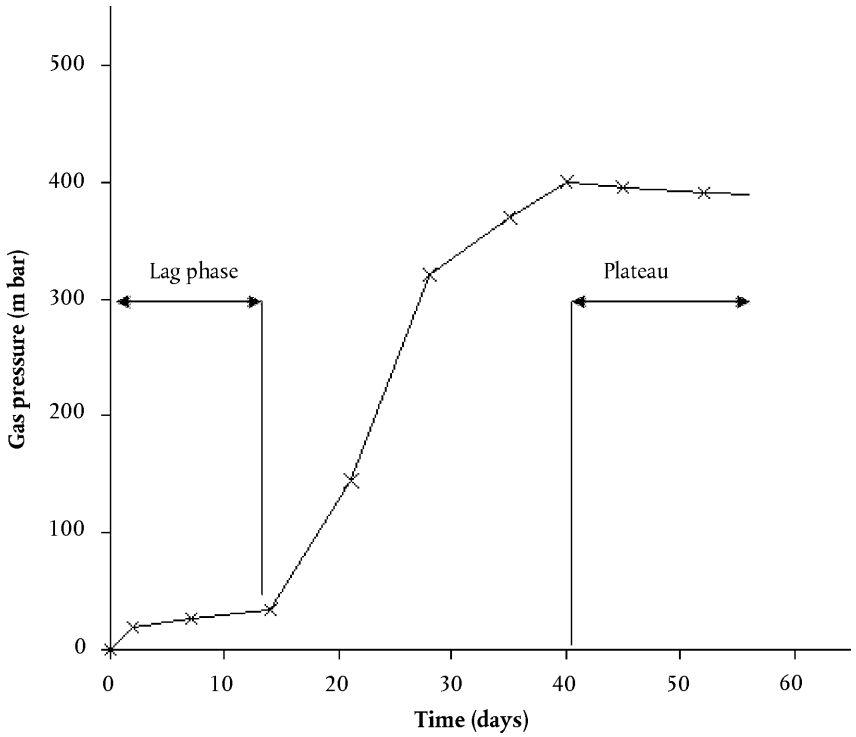
— zgornji postopek se v celoti ponovi z 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml in 50 ml zraka,

— grafično se prikaže krivulja pretvorbe tlaka (Pa) v odvisnosti od injicirane prostornine plina Vb (ml). Odziv instrumenta je linearen v razponu od 0 Pa do 70 000 Pa in od 0 ml do 50 ml nastalega plina.

▼**M6**

Dodatek 3

Primer krivulje razgradnje (skupno neto povečanje tlaka)



▼M6

Dodatek 4

Primer podatkovnih listov za preskus anaerobne biološke razgradnje – podatkovni list za preskusno snov

Laboratorij: ..... Preskusna snov: ..... Preskus št. .....

Preskusna temperatura: (°C): ..... Prostornina prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (V_h): .....(l) Prostornina tekočine (V_l): .....(l)

Ogljik v preskusni snovi $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Dan	p_1 (preskus) (milibari)	p_2 (preskus) (milibari)	p_3 (preskus) (milibari)	p (preskus) sredina (milibari)	p_4 (slepi) (milibari)	p_5 (slepi) (milibari)	p_6 (slepi) (milibari)	p (slepi) sredina (milibari)	p (neto) preskus – slepi sredina (milibari)	Δp (neto) skupaj (milibari)	m_h prostor v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina C ([2]) (mg)	D_h biološka razgradnja ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ preskus (mg)	$C_{IC,\ 2}$ preskus (mg)	$C_{IC,\ 3}$ preskus (mg)	C_{IC} sredina – preskus (mg)	$C_{IC,\ 4}$ slepi (mg)	$C_{IC,\ 5}$ slepi (mg)	$C_{IC,\ 6}$ slepi (mg)	C_{IC} sredina – slepi (mg)	$C_{IC,\ net}$ preskus – slepi sredina (mg)	m_l tekočina C ([4]) (mg)	m_t skupaj C ([5]) (mg)	D_t biološka razgradnja ([6]) (%)
Anorganski ogljik (konec)												
pH (konec)												

([1]) Ogljik v preskusni posodi, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Ogljik v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina, m_h (mg) pri normalni inkubacijski temperaturi (35): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Biološka razgradnja, izračunana iz plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

([4]) Ogljik v tekočini, m_l (mg): $m_l = C_{IC,\ net} \times V_l$.

([5]) Skupaj uplinjeni ogljik, m_t (mg): $m_t + m_l$.

([6]) Skupaj biološka razgradnja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$.

▼M6

Laboratorij: ..... Referenčna snov: ..... Preskus št. .....

Preskusna temperatura: (°C): ..... Prostornina prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina (V_h): .....(l) Prostornina tekočine (V_l) (litri): .....

Ogljik v referenčni snovi $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) .....(mg):

Dan	p_1 (ref.) (milibari)	p_2 (ref.) (milibari)	p_3 (ref.) (milibari)	p (ref.) sredina (milibari)	p_4 (inhib.) (milibari)	p_5 (inhib.) (milibari)	p_6 (inhib.) (milibari)	p (inhib.) sredina (milibari)	p (ref.) ref. – slepi (milibari)	Δp (ref.) skupaj (milibari)	m_h prostor v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina C ([2]) (mg)	D_h Biološka razgradnja ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} ref. – sredina (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. – sredina (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. – inhib. (mg)	m_l tekočina C ([4]) (mg)	m_t skupaj C ([5]) (mg)	D_t biološka razgradnja ([6]) (%)
Anorganski ogljik (konec)												
pH (konec)												

([1]) Ogljik v preskusni posodi, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Ogljik v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina, m_h (mg) pri normalni inkubacijski temperaturi (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Biološka razgradnja, izračunana iz plina v prostoru v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

([4]) Ogljik v tekočini, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Skupaj uplinjeni ogljik, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Skupaj biološka razgradnja, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼M6

C.44 IZPIRANJE V TALNIH KOLONAH

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 312 (2004). Umetne kemikalije lahko tla dosežejo neposredno z namerno uporabo (npr. agrokemikalije) ali po posrednih poteh (npr. odpadna voda → odpadno blato → tla ali zrak → mokro/suho odlaganje). Za oceno tveganja teh kemikalij je treba oceniti njihov potencial za transformacijo v tleh in premik (izpiranje) v globlje plasti tal ter postopno v podtalnico.

2. Na voljo je več metod za merjenje potenciala izpiranja kemikalij v tla v nadzorovanih laboratorijskih pogojih, tj. tankoplastna kromatografija tal, debeloplastna kromatografija tal, kolonska kromatografija tal ter meritve adsorpcije in desorpcije (1) (2). Pri neioniziranih kemikalijah porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (P_{ow}) omogoča zgodnjo oceno njihovega potenciala adsorpcije in izpiranja (3) (4) (5).

3. Metoda, opisana v tej preskusni metodi, temelji na kolonski kromatografiji tal v oviranih tleh (za opredelitev glej Dodatek 1). Za določitev (i) potenciala izpiranja preskusne kemikalije in (ii) potenciala izpiranja produktov transformacije (študija s starimi ostanki) v tleh v nadzorovanih laboratorijskih pogojih se izvajata dve vrsti poskusov ([1]). Ta preskusna metoda temelji na obstoječih smernicah (6) (7) (8) (9) (10) (11).

4. Na delavnici OECD o izbiri tal/usedline, ki je bila leta 1995 v Belgiratu v Italiji (12), je bil dosežen dogovor o številu in vrstah tal za uporabo pri tej preskusni metodi. Sprejeta so bila tudi priporočila glede odvzemanja, obravnavanja in shranjevanja vzorcev tal za poskuse v zvezi z izpiranjem.

NAČELO PRESKUSNE METODE

5. Kolone iz ustrezno inertnega materiala (npr. stekla, nerjavnega jekla, aluminija, teflona, PVC itd.) so napolnjene s tlemi, nasičene in uravnotežene z raztopino „umetnega dežja“ (za opredelitev glej Dodatek 1) ter nato osušene. Nato se površina vsake talne kolone tretira s preskusno kemikalijo in/ali starimi ostanki preskusne kemikalije. Umetni dež se nato vnese v talne kolone, izcedna voda pa se odvzame. Po izpiranju se tla odstranijo iz kolon in razdelijo na ustrezno število delov, odvisno od informacij, ki jih mora zagotoviti študija. V vseh delih tal in izcedni vodi se nato analizira preskusna kemikalija in, če je primerno, produkti transformacije ali druge aktualne kemikalije.

UPORABNOST PRESKUSNE METODE

6. Preskusna metoda se uporablja za preskusne kemikalije (neoznačene ali radioaktivno označene, npr. ^{14}C), za katere je na voljo dovolj natančna in občutljiva analitska metoda. Preskusna metoda se ne sme uporabljati za kemikalije, ki so hlapne v tleh in vodi ter zato ne ostanejo v tleh in/ali izcedni vodi v poskusnih pogojih te preskusne metode.

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

7. Preskusne kemikalije brez oznake ali z radioaktivno oznako se lahko uporabijo za merjenje obnašanja izpiranja v talnih kolonah. Radioaktivno označene

([1]) Študije izpiranja v kolonah s fitofarmacevtskimi sredstvi lahko zagotovijo informacije o mobilnosti preskusne kemikalije in njenih produktov transformacije ter lahko dopolnijo osnovne študije sorpcije.

▼M6

snovi so potrebne za proučevanje izpiranja produktov transformacije (stari ostanki preskusne kemikalije) in določitve masne bilance. Priporoča se oznaka ^{14}C, vendar so lahko koristni tudi drugi izotopi, kot so ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H in ^{32}P. Če je mogoče, se označi(-jo) najbolj stabilen(-lni) del(-i) molekule. Čistost preskusne kemikalije mora biti najmanj 95-odstotna.

8. Večino kemikalij je treba uporabiti kot eno snov. Vendar se lahko pri aktivnih snoveh v izdelkih za zaščito rastlin za proučevanje izpiranja matične preskusne snovi uporabljajo formulirani produkti, vendar je njihovo preskušanje potrebno zlasti, kadar bo zmes verjetno vplivala na hitrost sproščanja (npr. zrnaste formulacije ali formulacije z nadzorovanim sproščanjem). V zvezi s specifičnimi zahtevami za načrt preskusa zmesi bi lahko bilo koristno posvetovanje z regulativnim organom pred izvedbo preskusa. Za študije izpiranja starih ostankov je treba uporabiti čisto matično preskusno snov.

9. Pred izvajanjem preskusov izpiranja v talnih kolonah naj bi bile na voljo naslednje informacije o preskusni kemikaliji:

   (1) topnost v vodi [preskusna metoda A.6] (13);

   (2) topnost v organskih topilih;

   (3) parni tlak [preskusna metoda A.4] (13) in/ali Henryjeva konstanta;

   (4) porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda [preskusni metodi A.8 in A.24] (13);

   (5) adsorpcijski koeficient (K_d, K_f ali K_{OC}) [preskusni metodi C.18 in/ali C.19] (13);

   (6) hidroliza [preskusna metoda C.7] (13);

   (7) konstanta disociacije ((pK_a) [OECD TG 112] (25);

   (8) aerobna in anaerobna transformacija v tleh [preskusna metoda C.23] (13).

   Opomba: V ustreznih poročilih o preskusu je treba poročati o temperaturi, pri kateri so bile opravljene te meritve.

10. Količina preskusne kemikalije, vnesene v talne kolone, mora biti zadostna za zaznavo vsaj 0,5 % uporabljenega odmerka v katerem koli posameznem delu. Pri aktivnih kemikalijah v izdelkih za zaščito rastlin lahko količina uporabljene preskusne kemikalije ustrezna največji priporočeni stopnji uporabe (ena uporaba).

11. Na voljo mora biti primerna analitska metoda znane točnosti, natančnosti in občutljivosti za kvantifikacijo preskusne kemikalije in, če je ustrezno, njenih produktov transformacije v tleh in izcedni vodi. Znana mora biti tudi analitska meja zaznavnosti preskusne kemikalije in njenih pomembnih produktov transformacije (običajno vsaj vseh produktov transformacije $\geq$ 10 % uporabljenega odmerka, opaženega v študijah poteka transformacij, vendar raje katerih koli zadevnih produktov transformacije) (glej odstavek 17).

▼M6

REFERENČNE KEMIKALIJE

12. Za oceno relativne mobilnosti preskusne kemikalije v tleh je treba uporabiti referenčne kemikalije z znanim obnašanjem pri izpiranju, kot je atrazin ali monuron, ki se lahko štejejo za snovi z zmernim izpiranjem (1) (8) (11). Za potrditev hidrodinamičnih lastnosti talne kolone je lahko koristna tudi nesorpcijska in nerazgradljiva polarna referenčna kemikalija (npr. tritij, bromid, fluoroscein, eozin) za sledenje gibanja vode v koloni.

13. Kemikalije analitskega standarda so lahko koristne tudi za določitev značilnosti in/ali opredelitev produktov transformacije, najdenih v delih tal in izcednih vodah s kromatografsko, spektroskopsko ali drugo ustrezno metodo.

OPREDELITVE IN ENOTE

14. Glej Dodatek 1.

MERILA KAKOVOSTI

Izkoristek

15. Vsota deležev preskusne kemikalije, najdenih v delih tal in izcedni vodi kolone po izpiranju, je izkoristek poskusa izpiranja. Izkoristki morajo biti v razponu od 90 % do 110 % pri radioaktivno označenih kemikalijah (11) in od 70 % do 110 % pri neoznačenih kemikalijah (8).

Ponovljivost in občutljivost analitske metode

16. Ponovljivost analitske metode za kvantifikacijo preskusne kemikalije in produktov transformacije se lahko preveri s ponovljeno analizo istega ekstrakta dela tal ali izcedne vode (glej odstavek 11).

17. Meja zaznavnosti analitske metode za preskusno kemikalijo in produkte transformacije mora biti najmanj 0,01 mg · kg^{-1} v vsakem delu tal ali izcedni vodi (kot preskusna snov) ali 0,5 % uporabljenega odmerka v katerem koli posameznem delu, kar je manj. Opredeliti je treba tudi mejo določanja.

OPIS PRESKUSNE METODE

Preskusni sistem

18. Za preskus se uporabljajo kolone za izpiranje (deljive ali nedeljive) iz ustrezno inertnega materiala (npr. stekla, nerjavnega jekla, aluminija, teflona, PVC itd.) z notranjim premerom vsaj 4 cm in najmanjšo višino 35 cm. Preskusi se potencialno medsebojno delovanje materiala kolone in preskusne kemikalije in/ali njenih produktov transformacije. Primeri ustreznih deljivih in nedeljivih kolon so prikazani v Dodatku 2.

19. Za polnjenje talnih kolon se uporabljajo žlica, potisni bat in vibracijska oprema.

20. Za vnos umetnega dežja v talne kolone se lahko uporabljajo vlečni bat ali peristaltična črpalka, ročke za prho, steklenice za zagotavljanje stalne hitrosti pretoka ali enostavni liji kapalniki.

▼M6

Laboratorijska oprema in kemikalije

21. Potrebna je standardna laboratorijska oprema, zlasti:

(1) instrumenti za analizo, na primer oprema GLC, HPLC, TLC, vključno z ustreznimi sistemi zaznavanja za analiziranje označenih ali neoznačenih kemikalij ali inverzno metodo izotopskega redčenja;

(2) instrumenti za identifikacijo (npr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR itd.);

(3) tekočinski scintilacijski števec za radioaktivno označeno preskusno kemikalijo;

(4) oksidacijsko sredstvo za izgorevanje označenih snovi;

(5) naprave za ekstrakcijo (na primer centrifugirke za hladno ekstrakcijo in naprava Soxhlet za kontinuirano ekstrakcijo pod refluksom);

(6) instrumenti za koncentracijo raztopin in ekstraktov (npr. rotacijski evaporator).

22. Uporabljene kemikalije vključujejo: analitsko čista organska topila, kot so aceton, metanol itd., scintilacijsko tekočino, raztopino 0,01 M $CaCl_2$ v destilirani ali deionizirani vodi (= umetni dež).

Preskusna kemikalija

23. Preskusno kemikalijo je treba za vnos v talno kolono raztopiti v vodi (deionizirani ali destilirani). Če je preskusna kemikalija v vodi slabo topna, se lahko vnese kot formuliran produkt (po potrebi po suspendiranju ali emulgiranju v vodi) ali v katerem koli organskem topilu. Če se uporabi organsko topilo, ga je treba uporabiti čim manj in mora pred začetkom procesa izpiranja izhlapeti s površine talne kolone. Trdne formulacije, kot so zrnca, je treba vnesti v trdni obliki brez vode; za boljšo razporeditev po površini talne kolone se lahko formulirani produkt pred uporabo zmeša z majhno količino kremenovega peska (npr. 1 g).

24. Količina preskusne kemikalije, vnesene v talne kolone, mora biti zadostna za zaznavo vsaj 0,5 % uporabljenega odmerka v katerem koli posameznem delu. Pri aktivnih kemikalijah v izdelkih za zaščito rastlin lahko temelji na največji priporočeni stopnji uporabe (stopnja enega nanosa), pri čemer mora biti pri matičnem spiranju in spiranju starih ostankov povezana s površino uporabljene talne kolone ([1]).

Referenčna kemikalija

25. Pri poskusih izpiranja je treba uporabiti referenčno kemikalijo (glej odstavek 12). Na površino talne kolone jo je treba nanesti podobno kot preskusno kemikalijo z ustrezno hitrostjo, ki omogoča primerno zaznavanje kot notranji

([1]) Količina, ki jo je treba uporabiti v valjastih talnih kolonah, se lahko izračuna po naslednji enačbi:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

pri čemer je:
M = uporabljena količina na stolpec [μg],
A = stopnja uporabe [$kg \cdot ha^{-1}$],
d = premer talne kolone [cm],
π = 3,14.

▼M6

standard skupaj s preskusno kemikalijo v isti talni koloni ali samostojno kot ločena talna kolona. Obe kemikaliji naj bi se uporabili v isti talni koloni, razen če sta obe kemikaliji podobno označeni.

Tla

Izbira tal

26. Za študije izpiranja z matično preskusno kemikalijo je treba uporabiti 3 do 4 tla z različnim pH, vsebnostjo organskega ogljika in teksturo (12) Smernice za izbiranje tal za poskuse izpiranja so navedene v tabeli 1. Pri preskusnih kemikalijah, ki jih je mogoče ionizirati, morajo izbrana tla zajeti širok razpon pH, da se oceni mobilnost kemikalije v njeni ionizirani in neionizirani obliki; vsaj troje tal mora imeti pH, pri katerem je preskusna kemikalija v mobilni obliki.

Tabela 1

Smernice za izbiro tal za študije izpiranja

Tla št.	Vrednost pH	Organski ogljik %	Vsebnost gline %	Tekstura (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	glinasta ilovica
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	muljasta ilovica
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	ilovica
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	ilovnat pesek
5	< 4,5	> 10 #	< 10	ilovnat pesek/pesek

(*) Po sistemih FAO in USDA (14).

§ Najbolje je, da imajo ustrezne spremenljivke vrednosti znotraj razpona. Če se pojavijo težave pri iskanju ustreznega talnega materiala, so sprejemljive tudi vrednosti pod navedenim minimumom.

‡ Tla z manj kot 0,3 % organskega ogljika lahko povzročijo motnje v korelaciji med vsebnostjo organskih snovi in adsorpcijo. Zato je priporočljivo uporabiti tla z vsebnostjo organskega ogljika najmanj 0,3 %.

Tla z zelo veliko vsebnostjo ogljika (npr. > 10 %) ne smejo biti zakonsko sprejemljiva na primer za namene registracije pesticidov.

27. Občasno so lahko potrebne druge vrste tal, ki predstavljajo hladnejša, zmerna in tropska območja. Če se da prednost drugim vrstam tal, jih je zato treba opredeliti z istimi parametri in morajo imeti podobne razlike v lastnostih kot tiste, opisane v smernicah za izbiro tal za študije izpiranja (glej tabelo 1 zgoraj), čeprav niso popolnoma skladne z merili.

28. Za študije izpiranja s „starimi ostanki“ je treba uporabiti ena tla (12). Vsebnost peska v njih mora biti > 70 % in vsebnost organskega ogljika med 0,5 in 1,5 % (npr. tla št. 4 v tabeli 1). Uporaba več vrst tal je lahko potrebna, če so podatki o produktih transformacije pomembni.

29. Vse vrste tal je treba opredeliti vsaj glede teksture [% peska, % mulja, % gline v skladu s sistemi FAO in USDA za razvrščanje (14)], pH, kationske izmenjalne kapacitete, vsebnosti organskega ogljika, gostote v razsutem stanju (za ovirana tla) in zmogljivosti zadrževanja vode. Meritev mikrobne biomase je potrebna le za tla, ki se uporabljajo med staranjem/inkubacijo,

▼M6

izvedeno pred poskusom izpiranja s starimi odpadki. Informacije o dodatnih lastnostih tal (npr. razvrstitev tal, mineralogija gline, specifična površina) so lahko koristne pri razlagi rezultatov te študije. Za določitev značilnosti tal se lahko uporabijo metode, priporočene v virih (15) (16) (17) (18) (19).

Odvzemanje in shranjevanje tal

30. Tla je treba odvzeti z zgornje plasti (horizont A) do globine največ 20 cm. Ostanke vegetacije, makrofavne in kamnov je treba odstraniti. Tla (razen tal, ki se uporabljajo za staranje preskusne kemikalije) se sušijo na zraku pri sobni temperaturi (najbolje med 20 in 25 °C. Desagregacija (razdruževanje) se mora izvesti s čim manjšo silo, tako da se prvotna tekstura tal čim manj spremeni. Tla se presejejo skozi sito z luknjicami $\leq$ 2 mm. Priporočena je previdna homogenizacija, saj se s tem poveča obnovljivost rezultatov. Tla se lahko pred uporabo shranijo pri sobni temperaturi in posušena na zraku (12). Nobena omejitev časa shranjevanja ni priporočena, vendar je treba tla, ki se shranjujejo več kot tri leta, pred uporabo ponovno analizirati glede na njihovo vsebnost organskega ogljika in pH.

31. Na voljo morajo biti podrobne informacije o preteklosti mesta vzorčenja, kjer se odvzemajo tla za preskus. Podrobnosti vključujejo točno lokacijo [natančno definirano z UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ali zemljepisnimi koordinatami], pokritost z vegetacijo, uporabo kemikalij za zaščito pridelka, uporabo organskih in anorganskih gnojil, dodatke bioloških materialov ali naključno onesnaženje (12). Če so bila tla v predhodnih štirih letih tretirana s preskusno kemikalijo ali analognimi strukturami, se ne smejo uporabiti v študijah izpiranja.

Preskusni pogoji

32. V obdobju preskušanja je treba kolone za izpiranje hraniti v temi pri sobni temperaturi, dokler se ta temperatura vzdržuje v razponu ± 2 °C. Priporočajo se temperature med 18 in 25 °C.

33. Umetni dež (0,01 M $CaCl_2$) je treba neprekinjeno nanašati na površino talnih kolon s hitrostjo 200 mm v obdobju 48 ur ([1]); ta hitrost je enaka nanosu 251 ml za kolono z notranjim premerom 4 cm. Če je to potrebno za preskus, se lahko uporabijo tudi druge hitrosti umetnih padavin in daljše trajanje.

Izvajanje preskusa

Izpiranje z matično preskusno kemikalijo

34. Vsaj ponovitve kolon za izpiranje se napolnijo z netretiranimi, na zraku sušenimi in presejanimi tlemi (< 2 mm) do višine približno 30 cm. Za zagotovitev enotnega polnjenja se tla vnesejo v kolone v majhnih delih z žlico in s potisnim batom stisnejo s hkratnim nežnim vibriranjem tal, dokler

([1]) S tem se simulirajo zelo močne padavine. Povprečne letne padavine so na primer v srednji Evropi 800 – 1 000 mm.

▼M6

se vrh talne kolone ne pogrezne. Enotno polnjenje je potrebno, da se v kolonah za izpiranje zagotovijo obnovljivi rezultati. Za podrobnosti o tehnikah polnjenja kolon glej vire (20) (21) in (22). Za nadzor obnovljivosti postopka polnjenja se določi skupna teža tal v kolonah ([1]), teže ponovitvenih kolon morajo biti podobne.

35. Ko so talne kolone napolnjene, se zmočijo z umetnim dežjem (0,01 M $CaCl_2$) od spodaj navzgor, da voda izpodrine zrak iz por v tleh. Nato se v talnih kolonah vzpostavi ravnotežje, odvečna voda pa odteče zaradi težnosti. Metode za nasičevanje kolon so opisane v viru (23).

36. Nato se v talne kolone vnese preskusna kemikalija in/ali referenčna kemikalija (glej odstavke 23–25). Za homogeno razporeditev raztopin je treba suspenzije ali emulzije preskusne in/ali referenčne kemikalije enakomerno nanesti na površino talnih kolon. Če se za vnos preskusne kemikalije priporoča vključitev v tla, jo je treba zmešati z majhno količino (npr. 20 g) tal in nanesti na površino talne kolone.

37. Površine talnih kolon se nato prekrijejo s steklenim sintranim diskom, steklenimi kroglicami, filtri iz steklenih vlaken ali okroglim filtrirnim papirjem, da se umetni dež enakomerno razporedi po celotni površini in preprečijo motnje površine tal zaradi dežnih kapljic. Večji kot je premer kolone, bolj je treba paziti pri dodajanju umetnega dežja v talne kolone, da se zagotovi enakomerna porazdelitev umetnega dežja po celotni površini tal. Nato se umetni dež doda v talne kolone po kapljicah s pomočjo vlečnega bata ali peristaltične črpalke ali lija kapalnika. Po možnosti je treba izcedne vode zbrati v delih, njihove prostornine pa se zabeležijo ([2]).

38. Po izpiranju in odtekanju iz kolon se talne kolone razdelijo na ustrezno število delov, odvisno od informacij, ki jih mora zagotoviti študija, deli se ekstrahirajo z ustreznimi topili ali zmesmi topil, v njih pa se analizirajo preskusna kemikalija ter, kadar je ustrezno, produkti transformacije, skupna radioaktivnost in referenčna kemikalija. Izcedne vode ali deli izcednih vod se analizirajo neposredno ali po ekstrakciji za iste produkte. Če se uporabi preskusna kemikalija z radioaktivno oznako, je treba opredeliti vse dele, ki vsebujejo $\geq$ 10 % uporabljene radioaktivnosti.

Izpiranje s starimi ostanki

39. Sveža tla (ki niso bila predhodno sušena na zraku) se tretirajo s hitrostjo, ki ustreza površini talnih kolon (glej odstavek 24), z radioaktivno označeno preskusno kemikalijo in inkubirajo v aerobnih pogojih v skladu s preskusno metodo C.23 (13). Inkubacijsko obdobje (staranje) mora biti dovolj dolgo, da

([1]) Primeri gostot v razsutem stanju za ovirana tla so naslednji:za peščena tla 1,66 g · ml^{-1},
za tla iz ilovnatega peska 1,58 g · ml^{-1},
za ilovnata tla 1,17 g · ml^{-1},
za muljasta tla 1,11 g · ml^{-1}.

([2]) Značilne prostornine izcedne vode predstavljajo 230–260 ml, kar ustreza približno 92–104 % skupnega dodanega umetnega dežja (251 ml), kadar se uporabljajo talne kolone s premerom 4 cm in dolžino 30 cm.

▼M6

nastanejo znatne količine produktov transformacije; priporoča se obdobje staranja, ki traja polovico starosti preskusne kemikalije ([1]), vendar ne sme presegati 120 dni. Starana tla se pred izpiranjem analizirajo glede preskusne kemikalije in njenih produktov transformacije.

40. Kolone za izpiranje se do višine 28 cm napolnijo z istimi tlemi (vendar sušenimi na zraku), kot so bila uporabljena pri poskusu staranja, kot je opisano v odstavku 34, pri čemer se določi tudi skupna teža napolnjenih talnih kolon. Talne kolone se nato predhodno zmočijo, kot je opisano v odstavku 35.

41. Nato se preskusna kemikalija in njeni produkti transformacije nanesejo na površino talnih kolon v obliki starih ostankov tal (glej odstavek 39) kot 2 cm debel del tal. Skupna višina talnih kolon (netretirana tla + starana tla) naj ne bi presegla 30 cm (glej odstavek 34).

42. Izpiranje se izvede, kot je opisano v odstavku 37.

43. Po izpiranju se deli tal in izcedne vode analizirajo glede preskusne kemikalije, njenih produktov transformacije in neekstrahirane radioaktivnosti, kot je navedeno v odstavku 38. Za določitev količine starih odpadkov, ki se ohrani v zgornji dvocentimetrski plasti po izpiranju, je treba ta del analizirati ločeno.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

44. Količine preskusne kemikalije, produktov transformacije, snovi, ki jih ni mogoče ekstrahirati, in referenčne kemikalije, če je vključena, je treba navesti v % uporabljenega začetnega odmerka za vsak del tal v delu izcedne vode. Za vsako kolono je treba zagotoviti grafični prikaz deležev, ugotovljenih kot funkcija globin tal.

45. Če je v te študije izpiranja v kolonah vključena referenčna kemikalija, se lahko izpiranje kemikalije oceni na relativni lestvici z uporabo faktorjev relativne mobilnosti (RMF; za opredelitev glej Dodatek 3) (1) (11), ki omogoča primerjavo podatkov o izpiranju različnih kemikalij, pridobljenih pri različnih vrstah tal. Primeri vrednosti RMF za različne kemikalije za zaščito pridelka so navedeni v Dodatku 3.

46. Ocene K_{oc} (adsorpcijski koeficient, normiran na organski ogljik) in K_{om} (porazdelitveni koeficient, normiran na organsko snov) se lahko pridobi tudi na podlagi rezultatov izpiranja v kolonah z uporabo povprečne razdalje izpiranja ali določenih povezav med RMF in K_{om} oziroma K_{oc} (4) ali z uporabo enostavne kromatografske teorije (24). Vendar je treba slednjo metodo uporabljati previdno, zlasti ob upoštevanju, da proces izpiranja ne vključuje izključno nasičenih pogojev toka, ampak pogosto nenasičene sisteme.

([1]) V tleh lahko nastane več kot en večji produkt transformacije, ki se lahko pojavi tudi ob drugih časovnih točkah med študijo transformacije. V takih primerih bi lahko bilo treba izvesti študije izpiranja s starimi ostanki različnih starosti.

▼M6

Razlaga rezultatov

47. Študije izpiranja v kolonah, opisane v tej metodi, omogočajo določanje potenciala izpiranja ali mobilnosti preskusne kemikalije (v študiji matičnega izpiranja) in/ali njenih produktov transformacije (v študiji izpiranja starih ostankov) v tleh. Ti preskusi ne predvidevajo količinsko obnašanja pri izpiranju v terenskih pogojih, vendar se lahko uporabijo za primerjavo „sposobnosti izpiranja“ ene kemikalije z drugimi, katerih obnašanje pri izpiranju je morda znano (24). Podobno ne merijo količinsko deleža uporabljene kemikalije, ki bi lahko dosegel podtalnico (11). Vendar lahko rezultati študij izpiranja v kolonah pomagajo pri odločanju, ali je treba izvesti dodatno polterensko ali terensko preskušanje za kemikalije, ki v laboratorijskih preskusih kažejo velik potencial mobilnosti.

Poročilo o preskusu

48. Poročilo mora vsebovati:

Preskusna kemikalija in referenčna kemikalija (če se uporabi):

— splošno ime, kemijsko ime (nomenklatura IUPAC in CAS), številko CAS, kemijsko strukturo (z navedbo položaja oznak, kadar se uporabi radioaktivno označena snov) in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti,

— čistoče (nečistoče) preskusne kemikalije,

— radiokemijsko čistost označene kemikalije in specifično aktivnost (kadar je primerno).

Preskusna tla:

— podrobnosti o mestu odvzema,

— lastnosti tal, kot so pH, vsebnost organskega ogljika in gline, tekstura in gostota v razsutem stanju (za ovirana tla),

— mikrobno dejavnost tal (le za tla, uporabljena za staranje preskusne kemikalije),

— dolžino shranjevanja tal in razmere shranjevanja.

Preskusni pogoji:

— datume izvajanja študij,

— dolžino in premer kolon za izpiranje,

— skupno težo tal v talnih kolonah,

— količino uporabljene preskusne kemikalije in, če je primerno, referenčne kemikalije,

— količino, pogostost in trajanje nanašanja dodajanja umetnega dežja,

— temperaturo poskusnega okolja,

— število ponovitev (vsaj dve),

— metode za analizo preskusne kemikalije, produktov transformacije in, kadar je primerno, referenčne kemikalije v različnih delih tal in izcednih vod,

— metode za opis značilnosti in opredelitev produktov transformacije v delih tal in izcednih vod.

▼M6

Rezultati preskusa:

— tabele z rezultati, izraženimi kot koncentracije in kot % uporabljenega odmerka za dele tal in izcednih vod,

— masno bilanco, če je primerno,

— prostornine izcednih vod,

— razdalje izpiranja in, kadar je primerno, faktorje relativne mobilnosti,

— grafični prikaz %, ugotovljenega v delih tal glede na globino dela tal,

— razpravo o rezultatih in razlago rezultatov.

LITERATURA

(1) Guth, J. A., Burkhard, N., in Eberle, D. O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M. H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T. R. Roberts in P. C. Kearney, ur.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G. G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050– 1059.

(4) Chiou, C. T., Porter, P. E., in Schmedding, D. W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227–231.

(5) Guth, J. A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26–33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Priloga I k Direktivi Komisije 95/36/ES z dne 14. julija 1995 o spremembi Direktive Sveta 91/414/EGS o dajanju fitofarmacevtskih sredstev v promet, UL L 172, 22.7.1995, str. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4–2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, ur.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/ Sediments. Belgirate, Italija, 18.–20. januar 1995.

(13) Naslednja poglavja te priloge:

Poglavje A.4, Parni tlak,

Poglavje A.6, Topnost v vodi,

▼**M6**

Poglavje A.8, Porazdelitveni koeficient, metoda stresanja bučke,

Poglavje A.24, Porazdelitveni koeficient, metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC),

Poglavje C.7, Razgradnja – Abiotska razgradnja: hidroliza kot funkcija pH,

Poglavje C.18, Adsorpcija/desorpcija z uporabo metode šaržnih preskusov ravnotežja,

Poglavje C.23, Aerobna in anaerobna transformacija v tleh.

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, ur.). Agronomy Series No. 9, druga izdaja.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A. L. Page, R. H. Miller in D. R. Kelney, ur.). Agronomy Series No. 9, druga izdaja.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Prva izdaja.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt na Majni.

(19) Scheffer, F., in Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J. B., in Peeper, T. F. (1977). In Research Methods in Weed Science, druga izdaja (B. Truelove, ur.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73–78.

(21) Weber, J. B., Swain, L. R., Strek, H. J., in Sartori, J. L. (1986). In Research Methods in Weed Science, tretja izdaja (N.D. Camper, ur.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190–200.

(22) Oliveira idr. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49–53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177–217.

(24) Hamaker, J. W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. V: Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V. H. Freed, ur.), 115–133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Pariz.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitev pojmov in enote

Starani ostanki tal: preskusna kemikalija in produkti transformacije, prisotni v tleh po vnosu in dovolj dolgem obdobju, ki omogoča procese prenosa, adsorpcije, metabolizma in disipacije za spremembo porazdelitve in osnovnih kemijskih značilnosti nekaterih uporabljenih kemikalij (1).

Umetni dež: raztopina 0,01 M $CaCl_2$ v destilirani ali deionizirani vodi.

Povprečna razdalja izpiranja: dno dela tal, kjer je kumulativna izkoriščena kemikalija 50 % skupne izkoriščene preskusne kemikalije [poskus normalnega izpiranja] ali (dno dela tal, kjer je kumulativna izkoriščena kemikalija 50 % skupne izkoriščene preskusne kemikalije) – ((debelina staranih ostankov tal)/2) [študija izpiranja starih ostankov].

Kemikalija: snov ali zmes.

Izcedna voda: vodna faza, ki kaplja skozi talni profil ali talno kolono (1).

Izpiranje: proces, s katerim se kemikalija premakne navzdol po talnem profilu ali talni koloni (1).

Razdalja izpiranja: najgloblji del tal, v katerem je bilo po procesu izpiranja najdenih $\geq$ 0,5 % uporabljene preskusne kemikalije ali starih ostankov (enakovredna globini penetracije).

Meja zaznavnosti (LOD) in **meja določanja (LOQ)**: meja zaznavnosti (LOD) je koncentracija kemikalije, pod katero identitete kemikalije ni mogoče razlikovati od analitičnih artefaktov. Meja določanja (LOQ) je koncentracija kemikalije, pod katero koncentracije ni mogoče določiti s sprejemljivo natančnostjo.

Faktor relativne mobilnosti (RMF): (razdalja izpiranja preskusne kemikalije (cm))/(razdalja izpiranja referenčne kemikalije (cm)).

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

Produkt transformacije: vse kemikalije, ki so posledica biotskih ali abiotskih transformacijskih reakcij preskusne kemikalije, vključno s CO_2 in produkti, ki so vezani v ostankih.

Tla: mešanica mineralnih in organskih kemičnih sestavin, slednje vsebujejo spojine z visoko vsebnostjo ogljika in dušika in z veliko molsko maso, ki jih poseljujejo majhni (večinoma mikro-) organizmi. Tla se lahko obdelujejo v dveh stanjih:

— v neoviranem, kakor so se razvila s časom, z značilnimi plastmi različnih vrst tal;

— oviranem, kakor jih navadno najdemo na ornih zemljiščih ali kakor se pojavljajo, kadar se vzorci jemljejo s kopanjem in se uporablja ta preskusna metoda (2).

(1) Holland, P. T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167–1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (sprejeto 12. maja 1981).

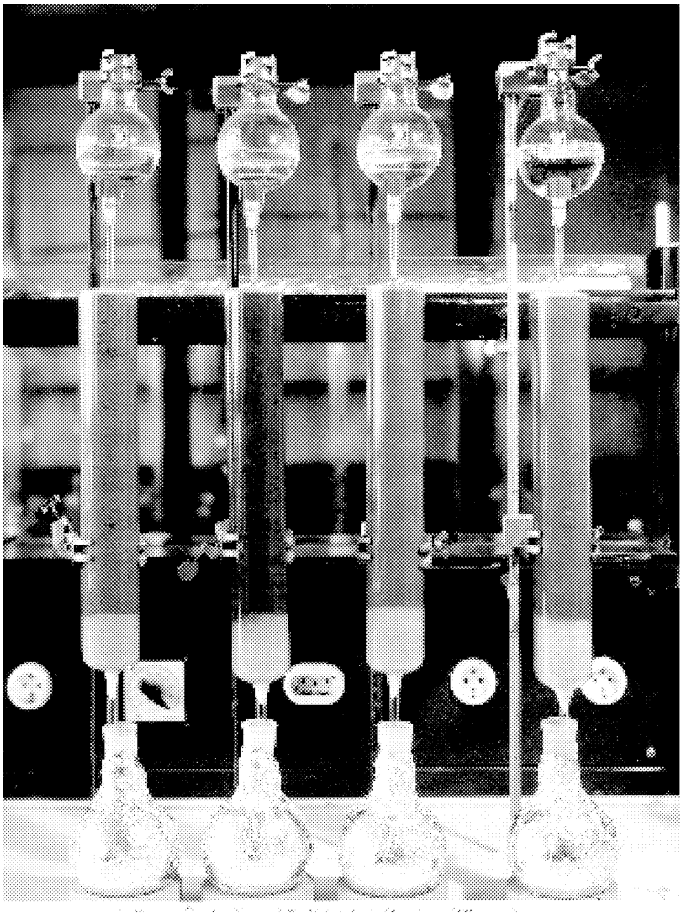
▼M6

Dodatek 2

Slika 1

Primer nedeljivih kolon za izpiranje iz stekla

z dolžino 35 cm in notranjim premerom 5 cm (1)



← Liji kapalniki za dovajanje umetnega dežja

← Stekleni sintrani disk za preprečevanje motenj površine tal in enakomerno razporeditev umetnega dežja

← Steklena kolona, napolnjena s preskusnimi tlemi (če se preskušajo fotolabilni produkti, je treba kolone oviti v aluminijasto folijo)

← Plast kremenovega peska

← Čep iz steklene volne, ki zadržuje tla v koloni

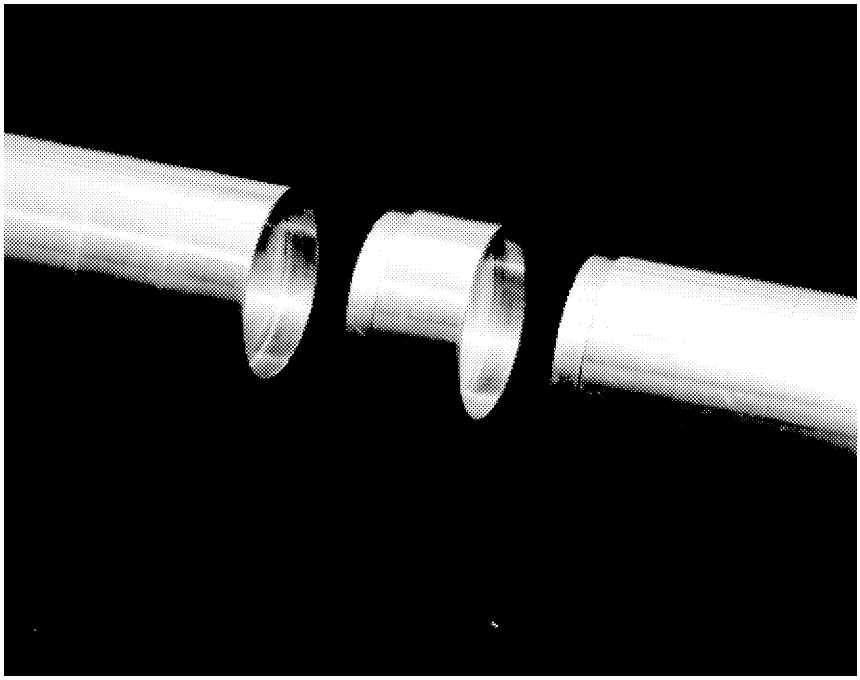
← Bučka z okroglim dom za zbiranje izcedne vode; ovita v aluminijasto folijo, da se prepreči fotoliza

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225–236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Slika 2

Primer deljive kovinske kolone z notranjim premerom 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D. O., in Guth, J. A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203–213.

▼M6

Dodatek 3

Primeri faktorjev relativne mobilnosti (*) (RMF) za različne kemikalije za zaščito pridelka (1) (2) in ustrezni razredi mobilnosti (+)

Razpon RMF	Kemikalija (RMF)	Razred mobilnosti
≤ 0,15	paration (< 0,15), flurodifen (0,15)	I nemobilen
0,15–0,8	profenofos (0,18), propikonazol (0.23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbutilazin (0,52), metidation (0,56), prometrin (0,59), propazin (0,64), alaklor (0,66), metolaklor (0,68)	II nekoliko mobilen
0,8–1,3	monuron (**) (1,00), atrazin (1,03), simazin (1,04), fluometuron (1,18)	III zmerno mobilen
1,3–2,5	prometon (1,67), cianazin (1,85), bromacil (1,91), karbutilat (1,98)	IV precej mobilen
2,5–5,0	karbofuran (3,00), dioksakarb (4,33)	V mobilen
> 5,0	monokrotofos (> 5,0), mikrotofos (> 5,0)	VI zelo mobilen

(*) Faktor relativne mobilnosti se izpelje, kot sledi (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{razdalja izpiranja preskusne kemikalije(cm)}}{\text{razdalja izpiranja referenčne kemikalije(cm)}}$$

(**) Referenčna kemikalija

\+ Drugi sistemi za razvrščanje mobilnosti kemikalije v tleh temeljijo na vrednostih R_f iz tankoplastne kromatografije tal \big(4) in vrednostih K_{oc} (5) (6).

(1) Guth, J. A. (1985). Adsorption/desorption. V Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.“ Canterbury, Združeno kraljestvo, 1.–3. julij 1985.

(2) Guth, J. A., in Hörmann, W. D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91–106.

(3) Harris, C. I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214–216.

(4) Helling, C. S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743–748.

(5) McCall, P. J., Laskowski, D. A., Swann, R. L., in Dishburger, H. J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J. M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165–174.

▼M6

C.45 **OCENA EMISIJ IZ LESA, TRETIRANEGA S SREDSTVI ZA ZAŠČITO LESA, V OKOLJE: LABORATORIJSKA METODA ZA LESNE PROIZVODE, KI NISO PREKRITI IN SO V STIKU S SLADKO VODO ALI MORSKO VODO**

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 313 (2007). Emisije iz lesa, tretiranega s sredstvi za zaščito lesa, v okolje je treba kvantificirati, da se omogoči ocena okoljskega tveganja tretiranega lesa. Preskusna metoda opisuje laboratorijsko metodo za oceno emisij iz lesa, tretiranega s sredstvi za zaščito lesa, v dveh primerih, kjer bi lahko emisije vstopile v okolje:

— emisije iz tretiranega lesa v stiku s sladko vodo. Emisije s površine tretiranega lesa bi lahko vstopile v vodo;

— emisije iz tretiranega lesa v stiku z morsko vodo. Emisije s površine tretiranega lesa bi lahko vstopile v vodo.

2. Ta preskusna metoda je namenjena preskušanju emisij iz lesa in lesnih proizvodov, ki niso prekriti in so v stiku s sladko vodo ali morsko vodo. Razredi uporabe se uporabljajo mednarodno in kategorizirajo biološko nevarnost, ki ji bodo izpostavljeni tretirani proizvodi. Razredi uporabe opredeljujejo tudi razmere, v katerih se tretirani proizvodi uporabljajo, in določajo ekosisteme (zrak, voda, tla), ki bi lahko bili izpostavljeni tveganju zaradi lesa, tretiranega s sredstvi za zaščito lesa.

3. Preskusna metoda je laboratorijski postopek za odvzem vzorcev (emisatov) iz vode, ki se uporablja za potapljanje tretiranega lesa, v vedno večjih časovnih razmikih po izpostavljenosti. Količina emisij v emisatu je povezana s površino lesa in trajanjem izpostavljenosti, da se oceni pretok v mg/m^2/dan. Zato se lahko oceni pretok (hitrost izpiranja) po vedno daljših obdobjih izpostavljenosti.

4. Količina emisij se lahko uporabi pri oceni okoljskega tveganja tretiranega lesa.

ZAČETNI POMISLEKI

5. Mehanizem izpiranja s sladko vodo na površini lesa se ne šteje za enakega vrsti in resnosti izpiranja s površine lesa z morsko vodo. Zato je za sredstva ali zmesi za zaščito lesa, ki se uporabljajo za tretiranje lesa, uporabljenega v okoljih z morsko vodo, potrebna študija izpiranja lesa z morsko vodo.

6. Les mora v primeru lesa, tretiranega s sredstvom za zaščito lesa, predstavljati komercialno uporabljen les. Tretirati ga je treba v skladu z navodili proizvajalca sredstva za zaščito lesa ter v skladu z ustreznimi standardi in specifikacijami. Pred začetkom preskusa je treba navesti parametre za kondicioniranje lesa po tretiranju.

7. Vzorci lesa, ki se uporabijo, morajo predstavljati uporabljene lesne proizvode (npr. glede vrste, gostote in drugih lastnosti).

▼M6

8. Preskus se lahko uporablja za les s postopkom penetracije ali površinskega nanosa ali za tretiran les, ki je dodatno obvezno površinsko tretiran (npr. z barvo, ki se nanese kot zahteva za komercialno uporabo).

9. Za določanje količine, vsebnosti in vrste emisij iz lesa so pomembni sestava, količina, pH in agregatno stanje vode.

NAČELO PRESKUSNE METODE

10. Preskusni vzorci lesa, tretiranega s sredstvi za zaščito lesa, se potopijo v vodo. Voda (emisat) se odvzame in kemijsko analizira večkrat v obdobju izpostavljenosti, ki je dovolj dolgo za izvedbo statističnih izračunov. Na podlagi analitskih rezultatov se izračunajo ravni emisije v mg/m^2/dan. Navesti je treba obdobja vzorčenja. Preskusi z netretiranimi vzorci se lahko prekinejo, če se v prvih treh podatkovnih točkah ne zazna naravno ozadje.

11. Vključitev netretiranih vzorcev lesa omogoča določitev ravni naravnega ozadja emisatov iz lesa, ki niso uporabljena sredstva za zaščito lesa.

MERILA KAKOVOSTI

Točnost

12. Točnost preskusne metode za oceno emisij je odvisna od preskusnih vzorcev, ki predstavljajo komercialno tretiran les, kako voda predstavlja dejansko vodo in kako režim izpostavljenosti predstavlja naravne pogoje.

13. Točnost, natančnost in ponovljivost analitske metode je treba določiti pred izvedbo preskusa.

Obnovljivost

14. Odvzamejo in analizirajo se trije vzorci vode, srednja vrednost pa se šteje za vrednost emisije. Obnovljivost rezultatov v enem laboratoriju in med različnimi laboratoriji je odvisna od režima potopitve in lesa, uporabljenega kot preskusni vzorec.

Sprejemljiv razpon rezultatov

15. Sprejemljiv je razpon rezultatov tega preskusa, kjer se zgornje in spodnje vrednosti razlikujejo za manj kot en red velikosti.

PRESKUSNI POGOJI

Voda

16. Scenariji izpiranja s sladko vodo: za uporabo v preskusu izpiranja, če se ocenjuje les, izpostavljen sladki vodi, se priporoča deionizirana voda (npr. ASTM D 1193, tip II). Temperatura vode mora biti 20 °C ± 2 °C, izmerjeni pH in temperaturo vode pa je treba vključiti v poročilo o preskusu. Analiza vzorcev uporabljene vode, odvzetih pred potopitvijo tretiranih vzorcev, omogoča oceno analiziranih kemikalij v vodi. To je kontrola za določitev ravni naravnega ozadja kemikalij, ki se nato kemijsko analizirajo.

▼M6

17. Scenariji izpiranja z morsko vodo: za uporabo v preskusu izpiranja, če se ocenjuje les, izpostavljen morski vodi, se priporoča sintetična morska voda (npr. ASTM D 1141, nadomestna oceanska voda brez težkih kovin). Temperatura vode mora biti 20 °C ± 2 °C, izmerjeni pH in temperaturo vode pa je treba vključiti v poročilo o preskusu. Analiza vzorcev uporabljene vode, odvzetih pred potopitvijo tretiranih vzorcev, omogoča oceno analiziranih kemikalij v vodi. To je kontrola za analizo ravni naravnega ozadja pomembnih kemikalij.

Preskusni vzorci lesa

18. Vrste lesa morajo biti značilne za vrste lesa, uporabljene za preskušanje učinkovitosti sredstev za zaščito lesa. Priporočene vrste so *Pinus sylvestris L.* (rdeči bor), *Pinus resinosa Ait.* (ameriški rdeči bor) ali *Pinus spp* (južni bor). Z drugimi vrstami se lahko izvedejo dodatni preskusi.

19. Uporabiti je treba les s premim potekom aksialnih elementov brez grč. Izogibati se je treba materialu smolnatega videza. Les mora predstavljati les, ki je komercialno dostopen. Zabeležiti je treba vir, gostoto in število letnic na 10 mm.

20. Preskusni vzorci lesa naj bi bili v skladu z velikostjo blokov iz EN 113(mere 25 mm × 50 mm × 15 mm) v sklopih po pet, pri čemer so vzdolžni profili vzporedni z aksialnimi elementi, čeprav se lahko uporabijo tudi druge mere, kot je 50 mm × 150 mm × 10 mm. Preskusni vzorec je treba v celoti potopiti v vodo. Preskusni vzorci morajo zajemati 100 % beljave. Vsak vzorec se edinstveno označi, da se lahko identificira kadar koli med preskusom.

21. Vsi vzorci morajo biti skobljani ali žagani tangentno na letnice, površine pa ne smejo biti obrušene.

22. Za analizo se uporabi vsaj pet sklopov preskusnih vzorcev lesa: trije sklopi vzorcev se tretirajo s sredstvom za zaščito lesa, en sklop vzorcev je netretiran, en sklop vzorcev pa se uporabi za oceno odstotka vlage po sušenju preskusnih vzorcev pred tretiranjem. Pripravi se dovolj preskusnih vzorcev za izbiro treh sklopov vzorcev, ki so v obsegu 5 % srednje vrednosti retencij sredstva za zaščito lesa vseh preskusnih vzorcev.

23. Vsi preskusni vzorci so na prečnem prerezu lesa zaščiteni s kemikalijo, ki preprečuje penetracijo sredstva za zaščito lesa v prečni prerez lesa vzorcev ali preprečuje izpiranje iz vzorcev prek prečnega prereza. Ločevati je treba med vzorci, ki se uporabljajo za površinski nanos, in postopki penetracije za nanos tesnilnega sredstva za prečni prerez lesa. Tesnilno sredstvo za prečni prerez lesa je treba nanesti pred tretiranjem le v primeru površinskega nanosa.

24. Prečni prerez lesa mora biti prost za tretiranje s postopki penetracije. Zato je treba prečni prerez lesa vzorcev zaščititi na koncu obdobja kondicioniranja. Emisijo je treba oceniti le za vzdolžno površino. Tesnilna sredstva je treba pregledati in po potrebi ponovno nanesti pred začetkom izpiranja, pri čemer se jih ne sme ponovno nanesti, ko se je izpiranje že začelo.

▼M6

Posoda za potopitev

25. Posoda je izdelana iz inertnega materiala in je dovolj velika, da lahko sprejme pet vzorcev lesa v skladu z EN 113 v 500 ml vode, pri čemer je razmerje med površino in prostornino vode 0,4 cm^2/ml.

Oprema za preskusne vzorce

26. Preskuse vzorce podpira oprema, ki zagotavlja, da so vse izpostavljene površine vzorca v stiku z vodo.

POSTOPEK TRETIRANJA S SREDSTVOM ZA ZAŠČITO LESA

Priprava tretiranih preskusnih vzorcev

27. Preskusni vzorec lesa, ki ga je treba tretirati s sredstvom za zaščito lesa, ki se preskuša, se tretira po metodi, določeni za sredstvo za zaščito lesa, kar je lahko s postopkom tretiranja s penetriranjem ali postopkom površinskega nanosa, ki je lahko potopitev, zanašanje ali premazovanje.

Sredstva za zaščito lesa, ki se nanašajo s postopki tretiranja s penetracijo

28. Pripraviti je treba raztopino sredstva za zaščito lesa, ki bo zagotovila določeno absorpcijo ali retencijo, kadar se nanaša s postopki tretiranja s penetracijo. Izmerijo se teža in mere preskusnega vzorca lesa. Postopek tretiranja s penetracijo mora biti takšen, kot je določen za nanos sredstev za zaščito na les, ki se uporablja kot razred uporabe 4 ali 5. Vzorec se po tretiranju ponovno stehta, retencija sredstva za zaščito lesa (kg/m^3) pa se izračuna po enačbi:

$$\frac{\text{masa po tretiranju(kg)} - \text{masa pred tretiranjem(kg)}}{\text{prostornina preskusna vzorca}(m^3)} \times \frac{\text{koncentracija raztopine(\% m/m)}}{100}$$

29. Opozoriti je treba, da se lahko v tem preskusu uporabi les, tretiran v industrijskem obratu za obdelavo \big(npr. z vakuumsko impregnacijo). Uporabljene postopke je treba zabeležiti, retencijo materiala, ki je bil tretiran po teh postopkih, pa je treba analizirati in zabeležiti.

Sredstva za zaščito lesa, ki se nanašajo s postopki površinskega nanosa

30. Postopki površinskega nanosa vključujejo potopitev, zanašanje ali premazovanje preskusnih vzorcev lesa. Postopek in stopnja nanosa (npr. litri/m^2) morata biti takšna, kot je določeno za površinski nanos sredstva za zaščito lesa.

31. V tem primeru je treba tudi opozoriti, da se lahko v tem preskusu uporablja tudi les, tretiran v industrijskem obratu za obdelavo. Uporabljene postopke je treba zabeležiti, retencijo materiala, ki je bil tretiran po teh postopkih, pa je treba analizirati in zabeležiti.

Kondicioniranje preskusnih vzorcev po tretiranju

32. Tretirane preskusne vzorce je treba po tretiranju kondicionirati v skladu s priporočili dobavitelja preskusnega sredstva za zaščito glede na zahteve za označevanje sredstva za zaščito lesa ali kot v skladu s praksami komercialnega tretiranja ali v skladu s standardom EN 252.

▼M6

Priprava in izbira preskusnih vzorcev

33. Po kondicioniranju po tretiranju se izračuna srednja retencija skupine preskusnih izračunov, za meritve izpiranja pa se naključno izberejo trije reprezentativni sklopi vzorcev z retencijo v razponu 5 % sredine skupine.

POSTOPEK ZA MERITVE EMISIJE SREDSTVA ZA ZAŠČITO LESA

Metoda potopitve

34. Preskusni vzorci se stehtajo in nato v celoti potopijo v vodo, pri čemer se zabeležita datum in čas. Posoda se prekrije, da se zmanjša izhlapevanje.

35. Voda se menjuje v naslednjih razmikih: 6 ur, 1 dan, 2 dni, 4 dni, 8 dni, 15 dni, 22 dni, 29 dni (opomba: to so skupni časi, ne časi razmikov). Zabeležiti je treba čas in datum menjave vode ter maso vode, odvzete in posode.

36. Po vsaki menjavi vode se vzorec vode, v kateri je bil potopljen sklop preskusnih vzorcev, zadrži za poznejšo kemijsko analizo.

37. Postopek vzorčenja omogoča izračun profila količine emisij v odvisnosti od časa. Vzorce je treba shraniti v pogojih, v katerih se analit ohrani, npr. v hladilniku v temi, da se zmanjša mikrobna rast v vzorcih pred analizo.

MERITVE EMISIJ

Tretirani vzorci

38. V odvzeti vodi se kemijsko analizirajo aktivna snov in/ali zadevni produkti razgradnje/transformacije, če je primerno.

Netretirani vzorci

39. Odvzem vode (emisata) v tem sistemu in poznejša analiza kemikalij, ki so bile izprane iz netretiranih vzorcev lesa, omogočata oceno mogoče ravni emisije sredstva za zaščito lesa iz netretiranega lesa. Odvzem in analiza emisata po podaljšanjih obdobjih izpostavljenosti omogočata oceno hitrosti spremembe ravni emisije glede na čas. Ta analiza je kontrolni postopek za določitev ravni naravnega ozadja preskusne kemikalije v netretiranem lesu za potrditev, da les, uporabljen kot vir vzorcev, ni bil predhodno tretiran s sredstvom za zaščito lesa.

PODATKI IN POROČANJE

Kemijske analize

40. Odvzeta voda se kemijsko analizira, pri čemer se rezultat analize vode izrazi v ustreznih enotah, npr. µg/l.

Sporočanje podatkov

41. Vsi rezultati se zabeležijo. V Dodatku sta navedena primer predlaganega obrazca za beleženje za en sklop tretiranih preskusnih vzorcev in zbirna tabela za izračun srednjih vrednosti emisije v posameznih razmikih vzorčenja.

42. Dnevni pretok emisije v mg/m^2/dan se izračuna tako, da se sredina treh meritev pri treh ponovitvah deli s številom dni potopitve.

▼M6

Poročilo o preskusu

43. V poročilo o preskusu je treba navesti vsaj naslednje informacije:

— naziv dobavitelja sredstva za zaščito lesa, ki se preskuša,

— določeno edinstveno ime ali oznako preskušanega sredstva za zaščito lesa,

— trgovsko ali splošno ime aktivnih snovi z generičnim opisom dodatkov (npr. pomožno topilo, smola) in sestavo v % m/m sestavin,

— zadevno retencijo ali obremenitev (v kg/m^3 oziroma l/m^2), določeno za les, ki se uporabi v stiku z vodo,

— vrste uporabljenega lesa z gostoto in hitrostjo rasti v letnicah na 10 mm,

— obremenitev ali retencijo preskušenega sredstva za zaščito lesa in enačbo, ki se uporabi za izračun retencije, izražene kot l/m^2 ali kg/m^3,

— metodo nanosa sredstva za zaščito lesa, pri čemer se navede uporabljen časovni razpored za postopek penetracije, in metodo nanosa, če se je uporabilo površinsko tretiranje,

— datum nanosa sredstva za zaščito lesa in oceno odstotka vlage v preskusnih vzorcih, izraženo v odstotkih,

— uporabljene postopke kondicioniranja, pri čemer se navedejo tip, pogoji in trajanje,

— specifikacijo tesnilnega sredstva za prečni prerez lesa in število nanosov,

— specifikacijo vseh poznejših tretiranj lesa, npr. specifikacijo dobavitelja, vrsto, značilnosti in obremenitev barve,

— čas in datum posamezne potopitve, količino vode, uporabljene za posamezno potopitev preskusnih vzorcev, in količino vode, ki jo med potopitvijo absorbira les,

— vsa odstopanja od opisane metode in vse dejavnike, ki bi lahko vplivali na rezultate.

LITERATURA

(1) Evropski standard EN 84:1997: Zaščitna sredstva za les – Pospešeno staranje zaščitenega lesa pred biološkim preskušanjem – Postopek izpiranja.

(2) Evropski standard EN 113/A1:2004: Zaščitna sredstva za les – Preskusna metoda za ugotavljanje preventivne učinkovitosti zaščitnih sredstev proti glivam odprtotrosnicam – Ugotavljanje toksičnih vrednosti.

(3) Evropski standard EN 252:1989: Terenska preskusna metoda za ugotavljanje relativne preventivne učinkovitosti zaščitnega sredstva za les v stiku z zemljo.

(4) Evropski standard EN 335 – Del 1: 2006. Trajnost lesa in lesnih materialov – Definicije razredov uporabe – Del 1: Splošno.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141–1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, zvezek 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193–77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, zvezek 11.01.

▼M6

Dodatek 1

Obrazec za beleženje za preskusno metodo

Ocena emisij iz lesa, tretiranega s sredstvi za zaščito lesa, v okolje: laboratorijska metoda za lesne proizvode, ki niso prekriti in so v stiku s sladko vodo ali morsko vodo

Preskusni laboratorij	

Sredstvo za zaščito lesa

Dobavitelj zaščitnega sredstva za les	
Določeno edinstveno ime ali oznaka zaščitnega sredstva za les	
Trgovinsko ali splošno ime zaščitnega sredstva za les	
Dodatki	
Ustrezna retencija za les, ki se uporabi v stiku z vodo	

Nanos

Metoda nanosa	
Datum nanosa	
Enačba, uporabljena za izračun retencije:	
Postopek kondicioniranja	
Trajanje kondicioniranja	
Tesnilno sredstvo za prečni prerez lesa/število nanosov	
Poznejše tretiranje	če je primerno

Preskusni vzorci

Vrste lesa	
Gostota lesa	(minimum … srednja vrednost … maksimum)
Hitrost rasti (letnice na 10 mm)	(minimum … srednja vrednost … maksimum)
Odstotek vlage	

▼M6

Obseg preskusa (*)	**Retencija (npr. kg/m^3)**
Tretiran „x“	srednja vrednost in standardni odklon ali razpon za 5 vzorcev
Tretiran „y“	srednja vrednost in standardni odklon ali razpon za 5 vzorcev
Tretiran „z“	srednja vrednost in standardni odklon ali razpon za 5 vzorcev
Netretiran	
Variacija parametrov preskusne metode	npr. kakovost vode, mere preskusnih vzorcev itd.

(*) x, y in z predstavljajo tri ponovitvene vzorce.

▼M6

Čas	Menjava vode	Masa vzorca		Absorpcija vode		Vzorec vode				
		Tretiran (sredina)	Netretiran	Tretiran (sredina)	Netretiran		Preskusna voda	x	y	z
	Datum	g	g	g	g	št.	pH	pH	pH	pH
začetek										
6 ur						1				
24 ur						2				
2 dni						3				
4 dni						4				
8 dni						5				
15 dni						6				
22 dni						7				
29 dni						8				

▼M6

Za vsako aktivno snov je treba pripraviti ločene tabele.

Čas	Menjava vode	Rezultati analize															
		Netretirani vzorci			Tretirani vzorci												
					Koncentracija aktivne sestavine v vodi				Izpuščena količina				Raven emisije			
		Koncentracija aktivne sestavine v vodi mg/l	Izpuščena količina mg/m^2	Raven emisije mg/m^2/dan	x	y	z	Sredina	x	y	z	Sredina	x	y	z	Sredina
	Datum				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan	mg/m^2/dan
6 ur																
24 ur																
2 dni																
4 dni																
8 dni																
15 dni																
22 dni																
29 dni																

Opomba: Ker bi se lahko rezultati netretiranih vzorcev uporabili za popravljanje ravni emisije iz tretiranih vzorcev, morajo biti prvi rezultati netretiranih vzorcev, vse vrednosti tretiranih vzorcev pa so „popravljene vrednosti“. Popravi se lahko tudi začetna analiza vode.

▼**M6**

Dodatek 2

Opredelitve

Kemikalija: snov ali zmes.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

▼M6

C.46 BIOAKUMULACIJA V BENTOŠKIH MALOŠČETINCIH, KI ŽIVIJO V USEDLINAH

UVOD

1. Ta preskusna metoda ustreza Smernici za preskušanje OECD (TG) 315 (2008). Endobentoške živali, ki jedo usedline, so lahko izpostavljene snovem v usedlinah (1). Med navedenimi živalmi, ki jedo usedline, imajo vodni maloščetinci pomembno vlogo v tleh vodnih sistemov. Živijo v usedlinah in so pogosto najpogostejše vrste, zlasti v habitatih z okoljskimi razmerami, ki so škodljive za druge živali. Z bioturbacijo usedlin in kot plen lahko te živali močno vplivajo na biološko razpoložljivost takih snovi za druge organizme, npr. bentivore vrste rib. V nasprotju z epibentoškimi organizmi se endobentoški vodni maloščetinci zarijejo v usedlino in jedo delce usedlin pod njihovo površino. Zato so ti organizmi izpostavljeni snovem prek številnih načinov absorpcije, vključno z neposrednim stikom, zaužitjem onesnaženih delcev usedline, porno vodo in vodo nad usedlino. Nekatere vrste bentoških maloščetincev, ki se trenutno uporabljajo pri ekotoksikološkem preskušanju, so opisane v Dodatku 6.

2. Med parametri, ki so značilni za bioakumulacijo snovi, so zlasti bioakumulacijski faktor (BAF), konstanta hitrosti absorpcije usedline (k_s) in konstanta hitrosti izločanja (k_e). Podrobnejše opredelitve navedenih parametrov so navedene v Dodatku 1.

3. Za oceno bioakumulacijskega potenciala snovi na splošno in proučitev bioakumulacije snovi, ki bi se lahko porazdelile v usedlini ali na njej, je potrebna preskusna metoda za posamezna področja (1) (2) (3) (4).

4. Ta preskusna metoda je zasnovana za oceno bioakumulacije snovi v usedlinah v endobentoških črvih maloščetincih. Preskusna snov se primeša v usedlino. Uporaba usedline s primešano preskusno snovjo naj bi simulirala onesnaženo usedlino.

5. Ta metoda temelji na obstoječih preskusnih metodah za strupenost usedlin in bioakumulacijo (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Drugi koristni dokumenti so: razprave in rezultati mednarodne delavnice (11) ter rezultat mednarodnega krožnega preskusa (12).

6. Ta preskus se uporablja za stabilne, nevtralne organske snovi, ki se lahko združijo z usedlinami. S to metodo se lahko meri tudi bioakumulacija stabilnih kovinoorganskih spojin v usedlini (12). Ne uporablja se za kovine in druge elemente v sledovih (11), če se načrt preskusa ne spremeni glede na prostornine substrata in vode ter po možnosti glede na velikost vzorca tkiva.

PREDPOGOJ IN INFORMACIJE O PRESKUSNI SNOVI

7. Obstaja le nekaj dobro uveljavljenih kvantitativnih razmerij med strukturo in aktivnostjo (QSAR) za procese bioakumulacije, ki so trenutno na voljo (14). Najpogosteje uporabljeno razmerje je korelacija med bioakumulacijo in biokoncentracijo stabilnih organskih snovi ter njihovo lipofilnostjo (izražena kot logaritem porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda (log K_{ow}); za opredelitev glej Dodatek 1), ki je bil razvit za opis porazdelitve snovi med vodo in ribe. Na podlagi tega razmerja so bile vzpostavljene tudi korelacije za

▼M6

področje usedlin (15) (16) (17) (18). Korelacija K_{ow}-log BCF je lahko kot pomembnejše kvantitativno razmerje med strukturo in aktivnostjo koristno za prvo predhodno oceno bioakumulacijskega potenciala snovi v usedlinah. Vendar lahko na BAF vpliva vsebnost lipidov preskusnega organizma in vsebnost organskega ogljika v usedlini. Zato se lahko tudi porazdelitveni koeficient organski ogljik/voda (K_{oc}) uporabi kot pomembnejša determinanta bioakumulacije organskih snovi v usedlini.

8. Ta preskus se uporablja za:

— stabilne organske snovi z vrednostmi log K_{ow} med 3,0 in 6,0 (5) (19) ter superlipofilne snovi, ki kažejo log K_{ow} več kot 6,0 (5),

— snovi, ki se uvrščajo v razred organskih snovi, znanih po svojem bioakumulacijskem potencialu v živih organizmih, npr. površinsko aktivne snovi ali zelo adsorpcijske snovi (npr. visok K_{oc}).

9. Pred začetkom študije je treba pridobiti informacije o preskusni snovi, kot so varnostni ukrepi, ustrezni pogoji shranjevanja, stabilnost in analitske metode. Navodila za preskušanje snovi, ki jih je težko preskušati zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti, so na voljo v (20) in (21). Pred izvajanjem preskusa bioakumulacije z vodnimi maloščetinci morajo biti znane naslednje informacije o preskusni snovi:

— splošno ime, kemijsko ime (najbolje ime IUPAC), strukturna formula, registrska številka CAS, čistost,

— topnost v vodi [preskusna metoda A.6 (22)],

— porazdelitveni koeficient oktanol/voda, K_{ow} [preskusni metodi A.8 in A.24 (22)],

— porazdelitveni koeficient usedlina/voda, izražen kot K_d ali K_{oc} [preskusna metoda C.19 (22)],

— hidroliza [preskusna metoda C.7 (22)],

— fototransformacija v vodi (23),

— parni tlak [preskusna metoda A.4 (22)],

— lahka biološka razgradljivost [preskusni metodi C.4 in C.29 (22)],

— površinska napetost [preskusna metoda A.5 (22)],

— kritična micelna koncentracija (24).

Poleg navedenega bi bile pomembne naslednje informacije, kadar so na voljo:

— biološka razgradnja v vodnem okolju [preskusni metodi C.24 in C.25 (22)],

— Henryjeva konstanta.

10. Radioaktivno označene preskusne snovi lahko pospešijo analizo vodnih vzorcev, vzorcev usedlin in bioloških vzorcev ter se lahko uporabijo pri odločitvi, ali je treba identificirati in kvantificirati produkte razgradnje. Opisana metoda je bila validirana z mednarodnim krožnim preskusom (12) za snovi z oznako ^{14}C. Če se merijo skupni radioaktivni ostanki, bioakumulacijski faktor (BAF) temelji na matični snovi, vključno z vsemi ohranjenimi

▼M6

produkti razgradnje. Študija metabolizma se lahko združi tudi s študijo bioakumulacije z analizo in kvantifikacijo deleža matične snovi in njenih produktov razgradnje v vzorcih, odvzetih na koncu absorpcijske faze ali na vrhuncu bioakumulacije. V vsakem primeru je priporočljivo, da izračun BAF temelji na koncentraciji matične snovi v organizmih in ne le na skupnih radioaktivnih ostankih.

11. Informacije, ki se zahtevajo poleg lastnosti preskusne snovi, so strupenost za vrsto maloščetincev, ki se uporabi v preskusu, kot je srednja smrtna koncentracija (LC_{50}) v času, potrebnem za absorpcijsko fazo, da se zagotovi, da so izbrane koncentracije izpostavljenosti veliko nižje od ravni strupenosti. Prednost je treba dati vrednostim strupenosti, ki izhajajo iz dolgotrajnih raziskav subletalnih končnih točk (EC_{50}), če so na voljo. Če taki podatki niso na voljo, se lahko koristne informacije zagotovijo s preskusom akutne strupenosti v pogojih, ki so enaki pogojem za preskus bioakumulacije, ali podatki o strupenosti za druge nadomestne vrste.

12. Na voljo mora biti ustrezna analitska metoda znane točnosti, natančnosti in občutljivosti za kvantifikacijo snovi v preskusnih raztopinah, usedlinah in biološkem materialu, pa tudi podrobnosti o pripravi in shranjevanju vzorcev ter varnostni listi za snov. Prav tako morajo biti znane analitske meje zaznavnosti preskusne snovi v vodi, usedlini in črvjem tkivu. Če se uporabi radioaktivno označena preskusna snov, morajo biti znani tudi specifična radioaktivnost (tj. Bq mol^{-1}), položaj radioaktivno označenega atoma in odstotek radioaktivnosti, povezan z nečistočami. Specifična radioaktivnost preskusne snovi mora biti čim večja, da se zaznajo čim nižje preskusne koncentracije (11).

13. Na voljo morajo biti informacije o značilnostih usedline, ki se uporabi (npr. izvor usedline ali njenih sestavin, pH in koncentracija amoniaka v porni vodi (naravne usedline), vsebnost organskega ogljika (TOC), porazdelitev delcev glede na velikost (odstotek peska, mulja in gline) in odstotek suhe teže) (6).

NAČELO PRESKUSA

14. Preskus obsega dve fazi: fazo absorpcije (izpostavljenost) in fazo izločanja (po izpostavljenosti). V fazi absorpcije so črvi izpostavljeni usedlini, ki ji je primešana preskusna snov, ter prekriti z modelno razredčevalno vodo in uravnoteženi, kot je primerno (11). Kontrolna skupna črvov se nahaja v enakih pogojih brez preskusne snovi.

15. Za fazo izločanja se črvi prenesejo v sistem usedline in vode brez preskusne snovi. Faza izločanja je potrebna za zbiranje informacij o hitrosti, s katero preskusni organizmi izločajo preskusno snov (19) (25). Faza izločanja je potrebna vedno, razen če je bila absorpcija preskusne snovi v fazi izpostavljenosti nepomembna (npr. ni statistične razlike med koncentracijo preskusne snovi v preskusnih in kontrolnih črvih). Če v fazi absorpcije ni bilo doseženo stabilno stanje, se lahko kinetika – BAF_k, konstanti hitrosti absorpcije in izločanja – določi z rezultati iz faze izločanja. Sprememba koncentracija preskusne snovi v črvih ali na njih se spremlja ves čas trajanja obeh faz preskusa.

16. V fazi absorpcije se meritve izvajajo, dokler BAF ne doseže ravnotežja ali stabilnega stanja. Faza absorpcije bi običajno morala trajati 28 dni. Praktične izkušnje kažejo, da je 12- do 14-dnevna faza absorpcije dovolj, da več stabilnih nevtralnih organskih snovi doseže stabilno stanje (6) (8) (9).

▼M6

17. Če pa stabilno stanje ni doseženo v 28 dneh, se faza izločanja začne s prenosom izpostavljenih maloščetincev v posode, ki vsebujejo enak medij brez preskusne snovi. Faza izločanja se prekine, ko se doseže 10-odstotna raven koncentracije, izmerjene v črvih na 28. dan faze absorpcije, ali po največ 10 dneh. Raven ostankov v črvih na koncu faze izločanja se zabeleži kot dodatna končna točka, npr. kot neizločeni ostanki (NER). Najbolje je, da se bioakumulacijski faktor (BAF_{ss}) izračuna kot razmerje koncentracije v črvih (C_a) in v usedlini (C_s) pri očitnem stabilnem stanju ter kot kinetični bioakumulacijski faktor, BAF_K, kot razmerje med konstanto hitrosti absorpcije iz usedline (k_s) in konstanto hitrosti izločanja (k_e) ob predpostavki kinetike prvega reda. Če stabilno stanje ni doseženo v 28 dneh, se BAF_K izračuna iz konstante hitrosti absorpcije in konstante hitrosti izločanja. Za izračun glej Dodatek 2. Če se kinetika prvega reda ne upošteva, je treba uporabiti bolj zapletene modele (Dodatek 2 in vir (25)).

18. Če stabilno stanje ni doseženo v 28 dneh, se lahko faza absorpcije podaljša, pri čemer se skupine izpostavljenih črvov, če so na voljo, izpostavijo nadaljnjim meritvam, dokler ni doseženo stabilno stanje; vzporedno se mora kljub temu na 28. dan faze absorpcije začeti faza izločanja.

19. Konstanta hitrosti absorpcije, konstanta hitrosti izločanja (ali konstante pri uporabi zapletenejših modelov), kinetični bioakumulacijski faktor (BAF_K), in kjer je mogoče, meje zaupanja za vse te parametre se izračunajo po računalniških modelnih enačbah (za modele glej Dodatek 2). Ustreznost prileganja modela je mogoče ugotoviti na podlagi korelacijskega koeficienta ali determinacijskega koeficienta (koeficienti blizu ena pomenijo dobro prileganje).

20. Za zmanjšanje variabilnosti rezultatov preskusa za organske snovi z visoko lipofilnostjo je treba izraziti tudi bioakumulacijske faktorje glede na vsebnost lipidov v preskusnih organizmih in vsebnost organskega ogljika (TOC) v usedlini (faktor akumulacije v organizmih glede na usedlino ali BSAF v kg TOC usedline kg^{-1} vsebnosti lipidov v črvih). Ta pristop temelji na izkušnjah in teoretskih korelacijah za vodno področje, kjer za nekatere kemijske razrede velja jasna povezava med potencialom snovi za bioakumulacijo in njeno lipofilnostjo, ki je bila dobro uveljavljena za ribe kot modelne organizme (14) (25) (27). Obstaja tudi povezava med vsebnostjo lipidov v preskusnih ribah in zaznano bioakumulacijo takih snovi. Podobne korelacije so bile ugotovljene tudi pri bentoških organizmih (15) (16) (17) (18). Če je na voljo dovolj črvjega tkiva, se lahko vsebnost lipidov v preskusnih živalih določi z uporabo istega biološkega materiala kot za določanje koncentracije preskusne snovi. Vendar je praktično uporabiti aklimatizirane kontrolne živali vsaj na začetku ali bolje na koncu faze absorpcije za meritev vsebnosti lipidov, ki se lahko nato uporabi za normaliziranje vrednosti BAF.

VELJAVNOST PRESKUSA

21. Za veljavnost preskusa veljata naslednja pogoja:

— Skupna smrtnost črvov (v kontrolah in tretiranih vzorcih) do konca preskusa ne sme preseči 20 % začetnega števila.

— Dokazati je treba tudi, da se črvi zarijejo v usedlino, kar omogoča čim večjo izpostavljenost. Za podrobnosti glej odstavek 28.

▼M6

OPIS METODE

Preskusne vrste

22. V preskusu se lahko uporabi več vrst vodnih maloščetincev. Najpogosteje uporabljene vrste so navedene v Dodatku 6.

23. Da se dokaže zdravstveno stanje preskusnih živali (1) (6), je treba preskuse strupenosti (96 ur, samo v vodi) izvajati v rednih časovnih razmikih (npr. vsak mesec) z referenčno strupeno snovjo, kot je kalijev klorid (KCl) ali bakrov sulfat ($CuSO_4$) (1). Če se referenčni preskusi strupenosti ne izvajajo v rednih časovnih razmikih, je treba serijo organizmov, ki se uporabijo v preskusu bioakumulacije v usedlini, preveriti z referenčno strupeno snovjo. Z meritvijo vsebnosti lipidov se lahko zagotovijo tudi koristne informacije o stanju živali.

Gojenje preskusnih organizmov

24. Da se zagotovi zadostno število črvov za izvajanje preskusov bioakumulacije, bo morda treba črve gojiti v stalni laboratorijski kulturi za posamezno vrsto. Metode laboratorijskega gojenja za izbrane preskusne vrste so povzete v Dodatku 6. Za podrobnosti glej vire (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Oprema

25. Pri vseh delih opreme se je treba izogibati uporabi materialov, ki se lahko raztopijo, adsorbirajo preskusne snovi ali iz katerih se lahko izperejo druge snovi in ki škodljivo učinkujejo na preskusne živali. Uporabiti je mogoče standardne pravokotne ali valjaste komore iz kemijsko inertnega materiala in s primerno prostornino, ki ustrezajo stopnji obremenitve, tj. številu preskusnih črvov. Pri dodajanju vode ali zraka se je treba izogibati uporabi mehkih plastičnih epruvet. Za vso opremo, ki je v stiku s preskusnim medijem, je treba uporabiti politetrafluoroetilen, nerjavno jeklo in/ali steklo. Pri snoveh z visokimi adsorpcijskimi koeficienti, kot so sintetični piretroidi, bo morda potrebno silanizirano steklo. V teh primerih je treba opremo po uporabi zavreči (5). Pri radioaktivno označenih preskusnih snoveh in hlapnih snoveh je potrebno pazljivo ravnanje, da se preprečita odstranitev in uhajanje odstranjene preskusne snovi. Uporabiti je treba lovilnike (npr. steklene plinske izpiralke), ki vsebujejo ustrezne absorbente za zadrževanje morebitnih ostankov, ki izparijo iz preskusnih komor (11).

Voda

26. Kakovost vode nad usedlino mora biti taka, da preskusni vrsti omogoča preživetje ves čas trajanja aklimatizacije in preskušanja, ne da bi pokazala kakršen koli neobičajen videz ali obnašanje. Priporoča se, da se v preskusih in laboratorijskih kulturah črvov kot voda nad usedlino uporabi modelna razredčevalna voda v skladu s preskusno metodo C.1 (25). Dokazano je bilo, da lahko v tej vodi preživi, raste in se razmnožuje več vrst (8), pri čemer se zagotovi čim večja standardizacija preskusnih pogojev in pogojev gojenja. Vodo je treba opredeliti vsaj glede pH, prevodnosti in trdote. Analiza vode, kar zadeva mikro onesnaževala, pred uporabo bi morala dati koristne informacije (Dodatek 4).

27. Voda mora biti ves čas preskusa enake kakovosti. pH vode nad usedlino mora biti med 6 in 9. Skupna trdota mora biti na začetku preskusa med 90 in 400 mg $CaCO_3$ na liter (7). Razponi za pH in trdoto v navedeni modelni

▼M6

razredčevalni vodi so navedeni v preskusni metodi C.1 (25). Če obstaja sum interakcije med ioni, ki povzročajo trdoto vode, in preskusno snovjo, je treba uporabiti vodo z manjšo trdoto. V Dodatku 4 so povzeta dodatna merila za sprejemljivo vodo za redčenje v skladu z OECD TG 210 (34).

Usedlina

28. Usedlina mora biti take kakovosti, ki omogoča preživetje in po možnosti razmnoževanje preskusnih organizmov med aklimatizacijo in preskušanjem, ne da bi bili pri tem videti nenormalno ali bi se nenormalno obnašali. Črvi se morajo zariti v usedlino. Obnašanje pri zarivanju lahko vpliva na izpostavljenost in zato za BAF. Zato je treba izogibanje usedlini ali obnašanje pri zarivanju zabeležiti, kadar motnost vode nad usedlino omogoča taka opazovanja. Črvi (v kontrolah in tretiranih vzorcih) se morajo v usedlino zariti v 24 urah po vnosu v preskusne posode. Če se ne zarijejo ali se opazi izogibanje usedlini (npr. več kot 20 % v več kot polovici faze absorpcije), to pomeni, da preskusni pogoji niso ustrezni, da preskusni organizmi niso zdravi ali da to obnašanje sproža koncentracija preskusne snovi. V takem primeru je treba preskus ustaviti in ponoviti v boljših pogojih. Dodatne informacije o zaužitju usedline se lahko dobijo z metodami, opisanimi v (35) (36), ki določajo zaužitje usedline ali izbiro delcev v preskusnih organizmih. Če je vsaj prisotnost iztrebkov ali njihova odsotnost na površini usedline opazna, kar kaže, da so črvi usedlino zaužili, jo je treba zabeležiti in obravnavati pri razlagi rezultatov preskusa glede na načine izpostavljenosti.

29. V preskusih in laboratorijskih kulturah črvov se priporoča uporaba umetne usedline, ki temelji na umetnih tleh, opisanih v preskusni metodi C.8 (40) (Dodatek 5), saj naravne usedline primerne kakovosti morda niso na voljo celo leto. Poleg tega lahko domorodni organizmi in možna prisotnost mikro onesnaževal v naravnih usedlinah vplivajo na preskus. V umetni usedlini lahko preživi, raste in se razmnožuje več vrst (8).

30. Umetno usedlino je treba opredeliti vsaj glede izvora sestavin, porazdelitve velikosti zrn (delež peska, mulja in gline) vsebnosti organskega ogljika (TOC), vsebnosti vode in pH. Meritev redoks potenciala je neobvezna. Vendar se lahko kot preskusne usedline in/ali usedline za gojenje uporabijo naravne usedline z neonesnaženih mest (1). Naravne usedline je treba opredeliti vsaj glede izvora (mesto odvzema), pH in amoniaka porne vode, vsebnosti organskega ogljika (TOC), porazdelitve delcev glede na velikost (delež peska, mulja in gline) ter deleža vsebnosti vode (6). Če se pričakuje razvoj amoniaka, se priporoča, da se naravna usedlina pred primešanjem preskusne snovi sedem dni kondicionira v enakih pogojih, kot vladajo v poznejšem preskusu. Na koncu tega obdobja kondicioniranja je treba vodo nad usedlino odstraniti in zavreči. Analiza usedline ali njenih sestavin, kar zadeva mikro onesnaževala, pred uporabo bi lahko dala koristne informacije.

Priprava

31. Ravnanje z naravnimi usedlinami pred uporabo v laboratoriju je opisano v (1) (6) (44). Priprava umetne usedline je opisana v Dodatku 5.

▼M6

Shranjevanje

32. Naravne usedline je treba v laboratoriju shranjevati čim manj časa. Po priporočilu U.S. EPA (6) je najdaljše obdobje shranjevanja 8 tednov v temi pri 4 ± 2 °C. V posodah za shranjevanje nad usedlino ne sme biti prostora v zaprti posodi nad fazno mejo plin-kapljevina. Priporočila za shranjevanje umetne usedline so navedena v Dodatku 5.

Aplikacija preskusne snovi

33. Usedlini se primeša preskusna snov. Postopek primešanja preskusne snovi vključuje prekritje ene ali več sestavin usedline s preskusno snovjo. Na primer kremenov pesek ali del njega (npr. 10 g kremenovega peska na preskusno posodo) se lahko namoči z raztopino preskusne snovi v ustreznem topilu, ki nato počasi izhlapi do suhega stanja. Prekriti del se lahko nato vmeša v vlažno usedlino. Pri pripravi usedline je treba upoštevati količino peska, prinesenega z mešanico preskusne snovi in peska, tj. usedlino je torej treba pripraviti z manj peska (6).

34. Pri naravni usedlini se lahko preskusna snov doda s primešanjem preskusne snovi v suhi del usedline, kot je opisano zgoraj za umetno usedlino, ali z vmešanjem preskusne snovi v mokro usedlino, pri čemer nato vsa uporabljena sredstva za raztapljanje izhlapijo. Primerna topila za primešanje preskusne snovi v usedlino so etanol, metanol, etilen glikol monometil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetilformamid in trietilen glikol (5) (34). Strupenost in hlapnost topila ter topnost preskusne snovi v izbranem topilu morajo biti glavna merila za izbiro primernega sredstva za raztapljanje. Dodatna navodila glede postopkov primešanja preskusne snovi so navedena v Environment Canada (1995) (41). Paziti je treba, da je preskusna snov, dodana usedlini, v njej temeljito in enakomerno razporejena. Ponovitvene podvzorce usedline s primešano preskusno snovjo je treba analizirati, da se preveri koncentracija preskusne snovi v usedlini in da se določi stopnja homogenosti razporeditve preskusne snovi.

35. Ko je usedlina s primešano preskusno snovjo in vodo nad usedlino pripravljena, je zaželeno, da se omogoči porazdelitev preskusne snovi med usedlino in vodno fazo. To je po možnosti treba storiti v temperaturnih in prezračevalnih pogojih, ki bodo uporabljeni v preskusu. Ustrezen čas za uravnoteženje je odvisen od usedline in snovi, lahko pa traja od več ur do več dni in v redkih primerih do več tednov (4 do 5 tednov) (28) (42). V tem preskusu se na uravnoteženje ne čaka, ampak se za to priporoča obdobje od 48 ur do 7 dni. Odvisno od namena študije, npr. kdaj je treba posnemati okoljske razmere, se lahko usedlina s primešano preskusno snovjo uravnoteži ali stara dlje (11).

IZVEDBA PRESKUSA

Predhodni preskus

36. Da se izboljšajo preskusni pogoji končno veljavnega preskusa, npr. izbira koncentracije preskusnih snovi, trajanje faze absorpcije in izločanja, bi bilo koristno izvesti predhodni poskus. Med predhodnim preskusom je treba opazovati in zabeležiti obnašanje črvov, na primer izogibanje usedlini, tj. kadar črvi pobegnejo iz usedline, kar bi lahko povzročila preskusna snov

▼M6

in/ali sama usedlina. Izogibanje usedlini se lahko uporabi tudi kot subletalni parameter v predhodnem preskusu za oceno koncentracij preskusne snovi, ki se uporabijo v preskusu bioakumulacije.

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje faze absorpcije

37. Preskusni organizmi so preskusni snovi izpostavljeni v fazi absorpcije. Prvi vzorec je treba odvzeti od 4 do 24 ur po začetku faze absorpcije. Fazo absorpcije je treba izvajati največ 28 dni (1) (6) (11), razen če se lahko dokaže, da je bilo ravnovesje doseženo že prej. Stabilno stanje je doseženo, ko: (i) je grafični prikaz bioakumulacijskih faktorjev v vseh obdobjih vzorčenja v odvisnosti od časa vzporeden s časovno osjo, (ii) se tri zaporedne analize BAF na vzorcih, odvzetih v razmiku najmanj dveh dni, druga od druge ne razlikujejo za več kot 20 % in (iii) ni statistično značilnih razlik med tremi obdobji vzorčenja (na podlagi statističnih primerjav, npr. analize variance in regresijske analize). Če stabilno stanje ni doseženo v 28 dneh, se lahko faza absorpcije konča z začetkom faze izločanja, pri čemer se lahko BAF_K izračuna iz konstant hitrosti absorpcije in izločanja (glej tudi odstavke 16 do 18).

Trajanje faze izločanja

38. Prvi vzorec je treba odvzeti od 4 do 24 ur po začetku faze izločanja, ker se lahko v začetnem obdobju pojavijo hitre spremembe v ostankih tkiva. Prekinitev faze izločanja se priporoča, če je koncentracija preskusne snovi nižja od 10 % koncentracije v stabilnem stanju ali po najdaljšem trajanju, tj. 10 dneh. Raven ostankov v črvih na koncu faze izločanja se sporoči kot sekundarna končna točka. Na to obdobje pa lahko vendarle vpliva obdobje, v katerem koncentracija preskusne snovi v črvih ostaja nad analitsko mejo zaznavnosti.

Preskusni organizmi

Število preskusnih črvov

39. Število črvov na vzorec mora zagotavljati takšno maso črvjega tkiva, da je masa preskusne snovi na vzorec na začetku faze absorpcije oziroma na koncu faze izločanja znatno večja od meje zaznavnosti preskusne snovi v biološkem materialu. V navedenih delih faze absorpcije in faze izločanja je koncentracija v preskusnih živalih običajno razmeroma nizka (6) (8) (18). Ker je teža posameznih živali v več vrstah vodnih maloščetincev zelo majhna (5– 10 mg mokre teže na posamezno žival pri *Lumbriculus variegatus* in *Tubifex tubifex*), se lahko črvi zadevne ponovitvene preskusne komore združijo za tehtanje in analizo preskusne kemikalije. Pri preskusnih vrstah z večjo težo posameznih živali (npr. *Branchiura sowerbyi*) se lahko uporabijo ponovitve, ki vsebujejo en osebek, vendar je treba v takih primerih število ponovitev povečati za pet za vsako točko vzorčenja (11) Opozoriti pa je treba, da vrsta *B. sowerbyi* ni bila vključena v krožni preskus (12), zato se ne priporoča kot prednostna vrsta v preskusu.

40. Uporabiti je treba črve podobne velikosti (za *L. variegatus* glej Dodatek 6). Prihajati morajo iz istega vira in biti odrasle ali velike živali istega starostnega razreda (glej Dodatek 6). Teža in starost živali bi lahko znatno vplivali na vrednosti BAF (npr. zaradi različne vsebnosti lipidov in/ali prisotnosti jajc); te parametre je treba točno zabeležiti. Za meritev srednje mokre in suhe teže je treba pred začetkom preskusa stehtati suho težo podvzorca.

▼M6

41. Pri *Tubifex tubifex* in *Lumbriculus variegatus* se v obdobju preskušanja pričakuje razmnoževanje. Odsotnost razmnoževanja v preskusu bioakumulacije je treba zabeležiti in upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa.

Obremenitev

42. Uporabiti je treba visoka razmerja med usedlino in črvi ter vodo in črvi, da se čim bolj zmanjša koncentracija preskusne snovi v usedlini med fazo absorpcije in preprečijo zmanjševanja koncentracije raztopljenega kisika. Izbrana stopnja obremenitve mora ustrezati tudi naravnim gostotam populacije izbrane vrste (43). Za *Tubifex tubifex* se priporoča na primer stopnja obremenitve 1–4 mg črvjega tkiva (mokra teža) na gram mokre usedline (8) (11). V virih (1) in (6) se za *L. variegatus* priporoča stopnja obremenitve ≤ 1 g suhe teže črvjega tkiva na 50 g organskega ogljika v usedlini.

43. Črvi, ki se bodo uporabili v preskusu, se odstranijo iz kulture s presejanjem usedline za kulturo. Živali (odrasli ali veliki črvi brez znakov nedavne fragmentacije) se prenesejo v steklene posode (npr. petrijevke), ki vsebujejo čisto vodo. Če se preskusni pogoji razlikujejo od pogojev gojenja, mora biti dovolj 24-urna faza aklimatizacije. Pred tehtanjem se iz črvov odstrani odvečna voda. To se lahko izvede s previdnim prenosom črvov na predhodno navlaženo papirnato brisačo. Za sušenje črvov se ne priporoča uporaba absorpcijskega papirja, saj bi ta lahko povzročil stres pri črvih ali jih poškodoval. Brunson in drugi (1998) priporočajo uporabo 1,33-kratne količine neosušenih črvov glede na ciljno biomaso. Teh dodatnih 33 % ustreza razliki med osušenimi in neosušenimi črvi (28).

44. Na začetku faze absorpcije (dan 0 preskusa) se preskusni organizmi odstranijo iz komore za aklimatizacijo in naključno razporedijo v posode (npr. petrijevke), ki vsebujejo modelno razredčevalno vodo, tako da se v vsako posodo dodajajo skupine dveh črvov, dokler ni v vsaki posodi deset črvov. Vsaka od teh skupin črvov se lahko naključno prenese v ločene preskusne posode, npr. z mehkimi kleščami iz plavljenega jekla. Preskusne posode se nato inkubirajo v preskusnih pogojih.

Hranjenje

45. Ker je vsebnosti hranilnih snovi v umetni usedlini majhna, je treba usedlino izboljšati z virom hrane. Da se izpostavljenost preskusnih organizmov ne bi podcenila, npr. s selektivnim hranjenjem z neonesnaženo hrano, je treba usedlini pred vnosom preskusne snovi dodati hrano, ki je potrebna za razmnoževanje in rast preskusnih organizmov (glej Dodatek 5).

Razmerje med usedlino in vodo

46. Priporočeno razmerje med usedlino in vodo je 1: 4 (45). To razmerje se šteje za primerno za ohranjanje koncentracij kisika na ustreznih ravneh in preprečevanje kopičenja amoniaka v vodi na usedlino. Vsebnost kisika v vodi nad usedlino je treba ohranjati pri nasičenosti ≥ 40 %. Vodo nad usedlino je treba nežno prezračevati (npr. 2–4 mehurčki na sekundo) s pasteurjevo pipeto, nastavljene približno 2 cm nad površino usedline, da se čim bolj zmanjšajo motnje usedline.

▼M6

Svetloba in temperatura

47. Obdobje osvetljenosti v kulturi in preskusu traja 16 ur (1) (6). Jakost svetlobe na območju preskusa mora biti približno 500 – 1 000 luksov. Temperatura mora biti ves čas preskusa 20 ± 2 °C.

Preskusne koncentracije

48. Za določanje kinetike absorpcije se uporabi ena koncentracija (čim nižja), vendar se lahko uporabi tudi druga (višja) koncentracija (npr. (46)). V tem primeru se vzorci odvzamejo in analizirajo v stabilnem stanju ali po 28 dneh, da se potrdi BAF, izmerjen pri nižji koncentraciji (11). Višjo koncentracijo je treba izbrati, da se izključijo škodljivi učinki (npr. z izbiro približno 1 % najnižje znane kronične učinkovite koncentracije EC_x, kot je izpeljana iz zadevnih študij kronične strupenosti). Nižje preskusne koncentracije morajo biti znatno višje od meje zaznavnosti v vzorcih usedline in bioloških vzorcih z uporabljeno analitsko metodo. Če je učinkovita koncentracija preskusne snovi blizu analitski meji zaznavnosti, se priporoča uporaba radioaktivno označene preskusne snovi z visoko specifično radioaktivnostjo.

Tretirane in kontrolne ponovitve

49. Najmanjše število tretiranih ponovitev za kinetične meritve mora biti tri na točko vzorčenja (11) v celotni fazi absorpcije in izločanja. Dodatne ponovitve je treba uporabiti npr. za neobvezne dodatne datume vzorčenja. Za fazo izločanja se pripravi ujemajoče se število ponovitev z usedlino brez primešane preskusne snovi v vodi nad usedlino, da se lahko tretirani črvi na koncu faze absorpcije prenesejo iz določenih tretiranih posod v netretirane posode. Skupno število tretiranih ponovitev mora biti zadostno za fazo absorpcije in fazo izločanja.

50. Namesto tega se lahko črvi, namenjeni vzorčenju v fazi izločanja, izpostavijo v veliki posodi, ki vsebuje usedlino s primešano preskusno snovjo iste serije, kot je bila uporabljena za kinetiko absorpcije. Dokazati je treba, da so preskusni pogoji (npr. debelina usedline, razmerje med usedlino in vodo, obremenitev, temperatura, kakovost vode) primerljivi s ponovitvami, namenjenimi za fazo absorpcije. Na koncu faze absorpcije je treba iz te posode za analizo odvzeti vzorce vode, usedline in črvov, zadostno število velikih črvov, ki ne kažejo znakov nedavne fragmentacije pa je treba previdno odstraniti in prenesti v ponovitve, pripravljene za fazo izločanja (npr. deset organizmov na ponovitveno posodo).

51. Če se poleg vode ne uporabi nobeno drugo topilo, je treba za biološko analizo in analizo naravnega ozadja zagotoviti vsaj 9 ponovitev negativne kontrole (vsaj 3 vzorci na začetku, 3 na koncu absorpcije in 3 na koncu izločanja). Če se za nanos preskusne snovi uporabi sredstvo za raztapljanje, je treba izvesti kontrolo s topilom (na začetku je treba vzorčiti vsaj 3 ponovitve, 3 na koncu faze absorpcije in 3 na koncu faze izločanja). V tem primeru je treba za vzorčenje na koncu faze absorpcije zagotoviti vsaj 4 ponovitve negativne kontrole (brez topila). Te ponovitve je mogoče biološko primerjati s kontrolo s topilom, da se pridobijo informacije o morebitnem vplivu topila na preskusne organizme. Podrobnosti so navedene v Dodatku 3.

▼M6

Pogostost meritev kakovosti vode

52. V fazi absorpcije in izločanja je treba v vodi nad usedlino izmeriti vsaj naslednje parametre kakovosti vode:

Temperatura	v eni posodi vsake stopnje tretiranja na datum vzorčenja in v eni kontrolni posodi enkrat na teden ter na začetku in koncu obdobja absorpcije in izločanja; zabeleži se lahko tudi temperatura v okoliškem mediju (zrak prostora ali vodna kopel) ali v eni reprezentativni preskusni posodi, npr. ves čas ali v urnih razmikih,
Vsebnost raztopljenega kisika	v eni posodi vsake stopnje tretiranja in v eni kontrolni posodi na datum vzorčenja; izrazi se v mg/L in % ASV (vrednost nasičenosti zraka),
Dovod zraka	nadzoruje se vsaj enkrat na dan (delavniki) in po potrebi prilagodi,
pH	v eni tretirani posodi vsake stopnje tretiranja na datum vzorčenja in v eni kontrolni posodi enkrat na teden ter na začetku in koncu obdobja absorpcije in izločanja,
Skupna trdota vode	vsaj v eni tretirani posodi in eni kontrolni preskusni posodi na začetku in koncu obdobja absorpcije in izločanja, izražena v mg/l $CaCO_3$,
Skupna vsebnost amoniaka	vsaj v eni tretirani posodi in eni kontrolni preskusni posodi na začetku in koncu obdobja absorpcije in izločanja; izražena v mg/l NH_4^+ ali NH_3 ali skupnega amonijskega dušika.

Vzorčenje in analiza črvov, usedline in vode

Časovni razpored vzorčenja

53. Primeri časovnih razporedov vzorčenja za 28-dnevno fazo absorpcije in 10-dnevno fazo izločanja so navedeni v Dodatku 3.

54. Vzorci vode in usedline se odvzamejo iz preskusnih komor za določitev koncentracije preskusne snovi pred vnosom črvov ter v fazah absorpcije in izločanja. Med preskusom se koncentracije preskusne snovi določijo v črvih, usedlini in vodi, da se spremlja razporeditev preskusne snovi v delih preskusnega sistema.

55. V fazi absorpcije in v fazi izločanja se črvi, usedlina in voda vzorčijo vsaj šestkrat.

56. Vzorčenje se nadaljuje, dokler se ne doseže ravnotežje (stabilno stanje) (glej Dodatek 1) ali 28 dni. Če se ravnotežje ne doseže v 28 dneh, naj se začne faza izločanja. Ko se začne faza izločanja, se določeni črvi prenesejo v ponovitvene komore, ki vsebujejo netretirano usedlino in vodo (glej odstavka 17 in 18).

Vzorčenje in priprava vzorcev

57. Vzorci vode se pridobijo z odlivanjem, izsesavanjem ali pipetiranjem prostornine, ki zadostuje za meritev količine preskuse snovi v vzorcu.

58. Preostala voda nad usedlino se previdno odlije ali izsesa iz preskusnih komor. Vzorce usedline je treba odvzeti previdno, da se črvi čim manj motijo.

▼M6

59. V času vzorčenja se vsi črvi odstranijo iz ponovitve preskusa, npr. s suspendiranjem usedline z vodo nad usedlino in porazdelitvijo vsebine posameznih ponovitev na plitev pladenj ter pobiranjem črvov s prijemalkami iz plavljenega jekla. Na plitvem steklenem ali jeklenem pladnju se hitro sperejo z vodo. Odvečna voda se odstrani. Črvi se previdno prenesejo v predhodno stehtano posodo in stehtajo. Črvi se žrtvujejo z zamrzovanjem (npr. ≤ – 18 °C). Zabeležiti je treba prisotnost in število kokonov in/ali mladičev.

60. Na splošno je treba črve stehtati in žrtvovati takoj po vzorčenju brez faze čiščenja prebavil, da se pridobi konzervativen BAF, ki vključuje vsebino onesnaženih prebavil in preprečijo izgube telesnih ostankov v katerem koli obdobju čiščenja prebavil izključno v vodi (8). Pričakuje se, da se snovi z log K_{ow} nad 5 v obdobju čiščenja prebavil izključno v vodi ne bodo znatno izločevale, medtem ko bi se lahko snovi z log K_{ow}, nižjim od 4, lahko izgubile v znatnih količinah (47).

61. V fazi izločanja črvi čistijo svoja prebavila v čisto usedlino. To pomeni, da meritve, izvedene neposredno pred fazo izločanja, vključujejo usedlino prebavil, medtem ko se šteje, da se po prvih 4–24 urah faze izločanja večina vsebnosti onesnaženih prebavil nadomesti s čisto usedlino (11) (47). Koncentracija v črvih iz tega vzorca se lahko nato šteje za koncentracijo tkiva po čiščenju prebavil. Da bi upoštevali razredčenje koncentracije preskusne snovi z neonesnaženo usedlino v fazi izločanja, je mogoče oceniti težo vsebnosti prebavil iz razmerja med mokro težo črvov in težo pepela črvov ali razmerja med suho težo črvov in težo pepela črvov.

62. Če je namen specifične študije merjenje biološke razpoložljivosti in dejanskih ostankov tkiva v preskusnih organizmih, je treba stehtati, 6 ur čistiti v čisti vodi (47) in pred analizo ponovno stehtati vsaj podvzorec tretiranih živali (npr. iz treh dodatnih ponovitvenih posod), po možnosti vzorčenih v stabilnem stanju. Podatki o teži črvov in telesni koncentraciji tega podvzorca se lahko nato primerjajo z vrednostmi, pridobljenimi iz neočiščenih črvov. Črvi, namenjeni meritvi izločanja, se ne smejo čistiti pred prenosom v čisto usedlino, da se čim bolj zmanjša dodatni stres za živali.

63. Zaželeno je, da se vzorci vode, usedline in črvov analizirajo takoj (tj. 1–2 dni) po odstranitvi, da se prepreči razgradnja ali druge izgube ter da se v teku preskusa izračunata približni hitrosti absorpcije in izločanja. S takojšnjo analizo se izognemo tudi zamudam pri ugotavljanju, kdaj je bilo doseženo ravnotežje.

64. Če se analiza ne izvede takoj, je treba vzorce shraniti v ustreznih pogojih. Pred začetkom študije se pridobijo informacije o stabilnosti in ustreznih pogojih shranjevanja za določeno preskusno snov (npr. trajanje in temperatura shranjevanja, postopki ekstrakcije itd.). Če take informacije niso na voljo in se oceni, da so nujne, se lahko za določitev stabilnosti pri shranjevanju hkrati izvedejo kontrole tkiv s primešano preskusno snovjo.

Kakovost analitske metode

65. Ker je za celoten postopek pomembna točnost, natančnost in občutljivost analitske metode, uporabljene za preskusno snov, je treba praktično preveriti, da sta natančnost in obnovljivost kemijske analize, kakor tudi rekuperacija preskusne snovi iz vzorcev vode, usedline in črvov, zadovoljivi za določeno

▼M6

metodo. Zagotoviti je treba tudi, da se preskusna snov v kontrolnih komorah ne zazna v koncentracijah, ki so višje od naravnega ozadja. Po potrebi se vrednosti C_w, C_s in C_a popravijo za rekuperacije in vrednosti naravnega ozadja kontrol. Med celotnim preskusom je treba vse vzorce obravnavati tako, da se čim bolj zmanjšata onesnaženje in izguba (npr. zaradi adsorpcije preskusne snovi na napravi za vzorčenje).

66. Zabeležiti in sporočiti je treba skupno rekuperacijo in rekuperacijo preskusne snovi v črvih, usedlini, vodi in lovilnikih, če se uporabijo, ki vsebujejo absorbente za zadrževanje izhlapele preskusne snovi.

67. Ker se priporoča uporaba radioaktivno označenih snovi, je mogoče analizirati skupno radioaktivnosti (npr. matičnih snovi in produktov razgradnje). Če pa je analitsko izvedljivo, lahko kvantifikacija matične snovi in produktov razgradnje v stabilnem stanju ali na koncu faze absorpcije zagotovi pomembne informacije. Če se take meritve nameravajo izvesti, je treba vzorce izpostaviti ustreznim postopkom ekstrakcije, da se lahko matična snov ločeno kvantificira. Kadar zaznani produkt razgradnje predstavlja znaten delež (npr. > 10 %) radioaktivnosti, izmerjene v preskusnih organizmih v stabilnem stanju ali na koncu faze absorpcije, se priporoča identifikacija takih produktov razgradnje (5).

68. Zaradi nizke biomase osebkov pogosto ni mogoče določiti koncentracije preskusne snovi v posameznih črvih, razen če se kot preskusna vrsta uporabi *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg mokre teže na črva) (11). Zato je združevanje osebkov, vzorčenih iz dane preskusne posode, sprejemljivo, vendar omejuje statistične postopke, ki se lahko uporabijo za podatke. Če sta določen statistični postopek in moč pomembna faktorja, je treba v preskus vključiti ustrezno število preskusnih živali in/ali ponovitvenih preskusnih komor, da se prilagodi zaželenemu združevanju, postopku in moči.

69. Priporoča se, da se BAF izrazi kot funkcija skupne mokre teže, skupne suhe teže ter po potrebi (npr. pri zelo lipofilnih snoveh) kot funkcija vsebnosti lipida in vsebnosti organskega ogljika usedline. Za določanje vsebnosti lipida je treba uporabiti ustrezne metode (48) (49). Kot standardna metoda (48) se lahko priporoči tehnika z ekstrakcijo kloroforma/metanola (50). Da bi se izognili uporabi kloriranih topil, pa se lahko uporabi prilagojena krožno preskušena metoda Bligha in Dyerja (50), kot je opisana v (51). Ker različne metode ne dajo enakih vrednosti (48), je pomembno navesti podrobnosti o uporabljeni metodi. Kadar je to mogoče, tj. če je na voljo dovolj črvjega tkiva, se vsebnost lipidov izmeri na istem vzorcu ali ekstraktu, kot je bil pripravljen za analizo preskusne snovi, ker je treba lipide pogosto odstraniti iz ekstrakta, preden se analizira s kromatografijo (5). Vendar je praktično uporabiti aklimatizirane kontrolne živali vsaj na začetku ali bolje na koncu faze absorpcije za meritev vsebnosti lipidov, npr. v treh vzorcih.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

70. Krivulja absorpcije preskusne snovi se dobi z grafičnim prikazom koncentracije preskusne snovi v črvih ali na njih v fazi absorpcije v odvisnosti od

▼M6

časa na aritmetični lestvici. Če je krivulja dosegla ravnotežje, se izračuna BAF_{ss} v stabilnem stanju:

$$\frac{C_a \text{v stabilnem stanju ali na 28. dan(sredina)}}{C_s \text{v stabilnem stanju ali na 28. dan(sredina)}}$$

71. Kinetični bioakumulacijski faktor (BAFK) se določi kot razmerje med ks in ke. Konstanta izločanja (ke) se običajno določi na podlagi krivulje izločanja (tj. grafičnega prikaza koncentracije preskusne snovi v črvih v fazi izločanja). Konstanta hitrosti absorpcije ne nato izračuna na podlagi kinetike krivulje absorpcije. Za izračun BAFK ter konstant hitrosti ks in ke je najbolje uporabiti računalniške metode za ocenjevanje nelinearnih parametrov (glej Dodatek 2). Če izločanje očitno ni prvega reda, je treba uporabiti kompleksnejše modele (25) (27) (52).

72. Faktor akumulacije v organizmih glede na usedlino (BSAF) se določi z normalizacijo BAFK za vsebnost lipidov v črvih in skupno vsebnost organskega ogljika v usedlini.

Razlaga rezultatov

73. Rezultate je treba razlagati previdno, kadar se izmerjene koncentracije preskusnih koncentracij pojavljajo na ravneh blizu meje zaznavnosti uporabljene analitske metode.

74. Jasno določeni krivulji absorpcije in izločanja sta pokazateljici kakovostnih podatkov o bioakumulaciji. Meje zaupanja za vrednosti BAF na podlagi dobro zasnovanih študij na splošno ne smejo presegati 25 % (5).

Poročilo o preskusu

75. Poročilo o preskusu mora vsebovati naslednje informacije:

Preskusna snov

— fizikalno stanje in fizikalno-kemijske lastnosti, npr. log K_{ow}, topnost v vodi,

— kemijske identifikacijske podatke; vir preskusne snovi, identiteto in koncentracijo vseh uporabljenih topil,

— če gre za radioaktivno označeno snov, točen položaj radioaktivnih atomov, specifično radioaktivnost in odstotek radioaktivnosti, združene z nečistočami.

Preskusne vrste

— znanstveno ime, sev, vir, morebitno predhodno tretiranje, aklimatizacijo, starost, red velikosti itd.

Preskusni pogoji

— uporabljeni preskusni postopek (npr. statični, polstatični ali pretočni),

— vrsto in značilnosti uporabljene osvetljenosti in obdobja osvetljenosti,

— načrt preskusa (npr. število, material in velikost preskusnih komor, prostornina vode, masa in prostornina usedline,stopnja nadomeščene vodne prostornine (za pretočne ali polstatične postopke), vsako prezračevanje pred preskusom in med njim, število ponovitev, število črvov na ponovitev, število preskusnih koncentracij, trajanje faz absorpcije in izločanja, pogostost vzorčenja),

▼M6

— metodo priprave preskusne snovi in dodajanja preskusne snovi ter razloge za izbiro metode,

— nominalne preskusne koncentracije,

— vir sestavin umetne vode in usedline ali, če se uporabijo naravni mediji, vir vode in usedline, opis vsakega predhodnega tretiranja, rezultate vseh dokazovanj sposobnosti preskusnih živali za življenje in/ali razmnoževanje v uporabljenih medijih, značilnosti usedline (pH, amoniak v porni vodi (naravne usedline) vsebnost organskega ogljika (TOC), porazdelitev delcev glede na velikost (delež peska, mulja in gline), delež vsebnosti vode in vse druge izvedene meritve) ter značilnosti vode (pH, trdota, prevodnost, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, koncentracija sledi klora (če so bile merjene) in vse druge izvedene meritve),

— nominalno in izmerjeno suho težo v % mokre teže (ali razmerje med suho težo in mokro težo) umetne usedline, izmerjeno suho težo v % mokre teže (ali razmerje med suho težo in mokro težo) za naravne usedline,

— kakovost vode v preskusnih komorah, kot jo določajo temperatura, pH, amoniak, skupna trdota in koncentracija raztopljenega kisika,

— podrobne informacije o tretiranju vzorcev vode, usedline in črvov, vključno s podrobnostmi o pripravi, shranjevanju, postopkih primešanja preskusne snovi, ekstrakciji in analitskih postopkih (in natančnosti) za preskusno snov ter o vsebnosti lipidov in rekuperaciji preskusne snovi.

Rezultati

— smrtnost kontrolnih črvov in črvov v posamezni preskusni komori ter vse zaznane subletalne učinke, vključno z nenormalnim obnašanjem (npr. izogibanje usedlini, prisotnost ali odsotnost iztrebkov, odsotnost razmnoževanja),

— izmerjeno suho težo v % mokre teže (ali razmerje med suho težo in mokro težo) usedline in preskusnih organizmov (koristno za normalizacijo),

— vsebnost lipidov v črvih,

— krivulje, ki prikazujejo kinetiko absorpcije in izločanja preskusne snovi pri črvih ter čas do vzpostavitve stabilnega stanja,

— C_a, C_s in C_w (s standardnim odklonom in razponom, če je primerno) za vse čase vzorčenja (C_a izražen v g kg^{-1} mokre in suhe teže celega telesa, C_s izražen v g kg^{-1} mokre in suhe teže usedline in C_w v mg l^{-1}). Če je potreben faktor akumulacije v organizmih glede na usedlino (BSAF, za opredelitev glej Dodatek 1) (npr. za primerjavo rezultatov dveh ali več preskusov, opravljenih z živalmi z različno vsebnostjo lipidov), je treba C_a dodatno izraziti v g kg^{-1} vsebnosti lipidov v organizmu, C_s pa je treba izraziti v g kg^{-1} organskega ogljika (OC) v usedlini,

— BAF (izražen v kg mokre usedline kg^{-1} mokrih črvov), konstanto hitrosti absorpcije usedline k_s (izražen v g mokre usedline kg^{-1} mokrih črvov d^{-1}) in konstanto hitrosti izločanja k_e (izražena v d^{-1}); dodatno se lahko sporoči BSAF (izražen v kg organskega ogljika v usedlini kg^{-1} vsebnosti lipidov v črvih),

▼**M6**

— neizločene ostanke (NER) na koncu faze izločanja,

— če se izmerijo: deleže matične snovi, produktov razgradnje in vezanih ostankov (tj. delež preskusne snovi, ki ga ni mogoče ekstrahirati z običajnimi metodami ekstrakcije), zaznane v preskusnih živalih,

— metode, uporabljene za statistične analize podatkov.

Vrednotenje rezultatov

— skladnost rezultatov z merili za veljavnost, navedenimi v odstavku 21,

— nepričakovane ali nenavadne rezultate, npr. nepopolno izločanje preskusne snovi iz preskusnih živali; v takih primerih se lahko koristne informacije zagotovijo na podlagi predhodnih študij.

▼M6

Dodatek 1

Opredelitve in enote

Umetna usedlina ali formulirana ali rekonstituirana ali sintetična usedlina je zmes snovi, uporabljenih za posnemanje fizičnih sestavin naravne usedline.

Bioakumulacija je povečanje koncentracije preskusne snovi v organizmu ali na njem glede na koncentracijo preskusne snovi v okoliškem mediju. Izhaja iz procesov biokoncentracije in biomagnifikacije (glej v nadaljevanju).

Bioakumulacijski faktor (BAF) kadar koli med fazo absorpcije tega preskusa bioakumulacije je koncentracija preskusne snovi v preskusnem organizmu ali na njem (C_a v g kg^{-1} mokre ali suhe teže), deljena s koncentracijo snovi v okoliškem mediju (C_s kot g kg^{-1} mokre ali suhe teže usedline). Za sklicevanje na enoti C_a in C_s ima BAF enoto kg usedline kg^{-1} črvov (15).

Bioakumulacijski faktorji, izračunani neposredno iz razmerja med konstanto hitrosti absorpcije usedline, ki se deli s konstanto hitrosti izločanja (k_s oziroma k_e, glej v nadaljevanju), se imenujejo kinetični bioakumulacijski faktor (BAF_K).

Biokoncentracija je povečanje koncentracije preskusne snovi v organizmu ali na njem izključno zaradi absorpcije prek telesne površine, ki je odvisno od koncentracije preskusne snovi v okoliškem mediju.

Biomagnifikacija je povečanje koncentracije preskusne snovi v organizmu ali na njem predvsem zaradi absorpcije iz onesnažene hrane ali plena, ki je odvisno od koncentracije preskusne snovi v hrani ali plenu. Biomagnifikacija lahko vodi do prenosa ali kopičenja preskusne snovi v prehranjevalnem spletu.

Faktor akumulacije v organizmih glede na usedlino (BSAF) je na lipide normalizirana koncentracija preskusne snovi v/na preskusnem organizmu v stabilnem stanju, deljena s koncentracijo snovi v usedlini v stabilnem stanju, normalizirano na organski ogljik. C_a se nato izrazi v g kg^{-1} vsebnosti lipidov v organizmu, C_s pa v g kg^{-1} vsebnosti organskih snovi usedline.

Obdobje kondicioniranja se uporablja za stabilizacijo mikrobne komponente usedline in za odstranitev npr. amoniaka, ki izhaja iz sestavin usedline; poteka pred primešanjem preskusne snovi v usedlino. Voda nad usedlino se po kondicioniranju običajno zavrže.

Izločanje preskusne snovi je odstranitev te snovi iz tkiva preskusnega organizma z aktivnimi ali pasivnimi procesi, ki se pojavijo neodvisno od prisotnosti ali odsotnosti preskusne snovi v okoliškem mediju.

Faza izločanja je čas po prenosu preskusnih organizmov iz onesnaženega medija v medij brez preskusne snovi, v kateri se proučuje izločanje (ali neto izguba) snovi iz preskusnih organizmov.

Konstanta hitrosti izločanja (k_e) je numerična vrednost, ki opredeljuje stopnjo znižanja koncentracije preskusne snovi v/na preskusnih organizmih po prenosu preskusnih organizmov iz medija s preskusno snovjo v medij brez kemikalije; k_e se izrazi v d^{-1}.

▼M6

Obdobje za uravnoteženje se uporablja za porazdelitev preskusne snovi med trdno fazo, porno vodo in vodo nad usedlino; poteka po primešanju preskusne snovi v usedlino in pred vnosom preskusnih organizmov.

Porazdelitveni koeficient oktanol/voda (K_{ow}) je uravnoteženo razmerje topnosti snovi v n-oktanolu in vodi, včasih izraženo tudi kot P_{ow}. Logaritem K_{ow} (log K_{ow}) se uporablja kot kazalnik potenciala kemikalije za bioakumulacijo.

Porazdelitveni koeficient organski ogljik/voda (K_{oc}) je uravnoteženo razmerje med koncentracijo snovi v/na delu usedline z organskim ogljikom in koncentracijo snovi v vodi.

Voda nad usedlino je voda nad usedlino v preskusni posodi.

Ravnotežje ali **stabilno stanje** je opredeljeno kot ravnotežje med procesoma absorpcije in izločanja, ki potekata hkrati v fazi izpostavljenosti. Stabilno stanje je v grafičnem prikazu BAF v odvisnosti od časa v vsakem obdobju vzorčenja doseženo, ko krivulja postane vzporedna s časovno osjo in se tri zaporedne analize BAF na vzorcih, odvzetih v razmiku najmanj dveh dni, druga od druge ne razlikuje za več kot 20 % ter ni statistično značilnih razlik med tremi obdobji vzorčenja. Za preskusne snovi, ki se počasi absorbirajo, so primernejši sedemdnevni razmiki (5).

Porna voda ali intersticijska voda je voda, ki zavzema prostor med delci usedline ali tal.

Konstanta hitrosti absorpcije usedline (k_s) je numerična vrednost, ki opredeljuje stopnjo povišanja koncentracije preskusne snovi v/na preskusnem organizmu zaradi absorpcije iz faze usedline. k_s se izrazi v g usedline kg^{-1} črvov d^{-1}.

Usedlina s primešano preskusno snovjo je usedlina, ki ji je bila dodana preskusna snov.

Bioakumulacijski faktor stabilnega stanja (BAF_{ss}) je BAF v stabilnem stanju in se ne spreminja znatno v daljšem časovnem obdobju, saj je koncentracija preskusne snovi v okoliškem mediju (C_s v $g \cdot kg^{-1}$ mokre ali suhe teže usedline) v tem obdobju konstantna.

Faza absorpcije ali izpostavitve je čas, v katerem so preskusni organizmi izpostavljeni preskusni snovi.

▼M6

Dodatek 2

Izračun parametrov absorpcije in izločanja

Glavni cilj preskusa bioakumulacije je določitev bioakumulacijskega faktorja BAF. Izmerjeni BAF se lahko izračuna tako, da se koncentracija preskusne snovi v preskusnem organizmu, C_a, deli s koncentracijo preskusne snovi v usedlini, C_s, v stabilnem stanju. Če se stabilno stanje v fazi absorpcije ne doseže, se BAF izračuna enako kot za 28. dan. Vendar je treba navesti, ali BAF temelji na koncentracijah v stabilnem stanju ali ne.

Za izračun kinetičnega bioakumulacijskega faktorja (BAF_K), konstante hitrosti absorpcije usedline (k_s) in konstante hitrosti izločanja (k_e) je najbolje uporabiti računalniške metode za ocenjevanje nelinearnih parametrov. Glede na časovne vrste povprečnih akumulacijskih faktorjev (C_a, srednje vrednosti vseh datumov vzorčenja/C_s, srednje vrednosti vseh datumov vzorčenja = AF) faze absorpcije na podlagi mokre teže črvov in usedline ter modelne enačbe

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[enačba 1]}$$

pri čemer je AF(t) razmerje med koncentracijo preskusne snovi v črvih in njene koncentracije v usedlini ob kateri koli dani časovni točki (t) faze absorpcije, ti računalniški programi izračunajo vrednosti za BAF_K, k_s in k_e.

Ko se v fazi absorpcije doseže stabilno stanje (tj. $t = \infty$), se lahko enačba 1 poenostavi na

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[enačba 2]}$$

pri čemer je

k_s = konstanta hitrosti absorpcije v tkivu [g usedline kg^{-1} črvov d^{-1}],

k_e = konstanta hitrosti izločanja [d^{-1}].

Nato je $k_s/k_e \times C_s$ pristop za ugotavljanje koncentracije preskusne snovi v črvjem tkivu v stabilnem stanju ($C_{a,ss}$).

Faktor akumulacije v organizmih glede na usedlino (BSAF) je treba izračunati na naslednji način:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

pri čemer je foc del organskega ogljika v usedlini in flip del lipidov v črvih, pri čemer oba temeljita na suhi teži ali mokri teži.

Glede na časovne vrste koncentracijskih vrednosti se lahko kinetika izločanja modelira z naslednjimi modelnimi enačbami in računalniškim izračunom na podlagi metode za ocenjevanje nelinearnih parametrov.

Srednji izmerjeni telesni ostanki na koncu faze absorpcije se priporočajo kot privzeta začetna točka. Vrednost, modelirana/ocenjena na podlagi faze absorpcije, se lahko uporabi le, če npr. izmerjena vrednost znatno odstopa od modeliranih telesnih ostankov. Za alternativno predhodno izpostavljenost črvov, namenjenih za izločanje, glej tudi odstavek 50; pri tem pristopu se šteje, da vzorci teh predhodno izpostavljenih črvov na dan 0 faze izločanja zagotavljajo realne telesne ostanke za začetek kinetike izločanja.

▼M6

Če podatkovne točke, grafično prikazane v odvisnosti od časa, kažejo konstantno eksponentno padanje koncentracije preskusne snovi v živalih, je mogoče za opis časovnega poteka izločanja uporabiti enodelni model (enačba 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[enačba 3]}$$

Procesi izločanja so včasih videti dvofazni, pri čemer v zgodnjih fazah C_a hitro upada, kar se v poznejših fazah izločanja spremeni v počasnejšo izgubo preskusnih snovi (8) (19) (25). Ti dve fazi je mogoče razložiti s predpostavko, da sta v organizmu dva različna dela, iz katerih se preskusna snov izloča z različno hitrostjo. V takih primerih je treba proučiti posebne vire (15) (16) (17) (25).

Dvodelno izločanje se opiše npr. z naslednjo enačbo (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[enačba 4]}$$

A in B predstavljata velikost delov (v odstotku skupnih ostankov tkiva), pri čemer je A del s hitrim izločanjem snovi in B del s počasnih izločanjem preskusne snovi. Vsota A in B je 100 % celotne prostornine dela živali v stabilnem stanju. k_a in k_b predstavljata ustrezni konstanti izločanja [d^{-1}]. Če je dvodelni model prilagojen podatkom o očiščenju, se lahko konstanta hitrosti absorpcije k_s določi, kot sledi (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[enačba 5]}$$

Kljub temu je treba te modelne enačbe uporabljati previdno, zlasti kadar se med preskusom spremeni biološka razpoložljivost preskusne snovi (42).

Namesto z zgoraj opisanimi modelnimi enačbami se lahko kinetika (k_s in k_e) izračuna tudi naenkrat z modelom kinetike prvega reda za vse podatke iz faz absorpcije in izločanja skupaj. Opis metode, ki lahko omogoča tak združeni izračun konstant hitrosti absorpcije in izločanja, je naveden v virih (55), (56) in (57).

Neizločene ostanke (NER) je treba izračunati kot sekundarno končno točko, tako da se razmerje med povprečno koncentracijo v črvih (C_a) na 10. dan faze izločanja in povprečno koncentracijo v črvih (C_a) v stabilnem stanju (28. dan faze absorpcije) pomnoži s 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{at the end of elimination}(\textit{average}) \times 100}{C_a \textit{at steady state}(\textit{average})}}$$

▼M6

Dodatek 3

Primer časovnega razporeda vzorčenja za 28-dnevni preskus bioakumulacije

(a) **Faza absorpcije (vključno s 4-dnevno fazo uravnoteženja)**

Dan	Dejavnosti
– 6	priprava šotne suspenzije za usedlino; 48-urno kondicioniranje suspenzije
– 4	primešanje preskusne snovi v usedlino ali del usedline; mešanje vseh sestavin usedline; odstranitev vzorcev usedline iz tretiranih vzorcev in usedline iz kontrole s topilom za določitev koncentracije preskusne snovi; dodajanje vode nad usedlino; inkubacija pri preskusnih pogojih (faza uravnoteženja)
– 3/– 2	ločitev preskusnih organizmov od kulture za aklimatizacijo
0	meritev kakovosti vode (glej odstavek 52); odstranjevanje ponovitev za odvzem vzorcev vode in usedline za določitev koncentracije preskusne snovi; naključna razporeditev črvov v preskusne komore, zadržanje dovolj podvzorcev črvov za določitev analitskih vrednosti naravnega ozadja; nadzor dovajanja zraka, če se uporabi zaprti preskusni sistem
1	odstranitev ponovitev za vzorčenje, nadzor dovajanja zraka, obnašanja črvov in kakovosti vode (glej odstavek 56), odvzem vzorcev vode, usedline in črvov za določitev koncentracije preskusne snovi
2	nadzor dovajanja zraka, obnašanja črvov in temperature
3	enako kot 1. dan
4–6	enako kot 2. dan
7	enako kot 1. dan; po potrebi nadomestitev izhlapele vode
8–13	enako kot 2. dan
14	enako kot 1. dan; po potrebi nadomestitev izhlapele vode
15–20	enako kot 2. dan
21	enako kot 1. dan; po potrebi nadomestitev izhlapele vode
22–27	enako kot 2. dan
28	enako kot 1. dan; meritev kakovosti vode (glej odstavek 52); konec faze absorpcije, zadržanje dovolj podvzorcev črvov za določitev analitskih vrednosti naravnega ozadja, mokre in suhe teže ter vsebnosti lipidov; prenos črvov iz preostalih izpostavljenih ponovitev v posode s čisto usedlino za fazo izločanja (brez čiščenja prebavil; vzorčenje vode, usedline in črvov iz kontrol s topilom; vzorčenje raztopin za lovljenje, če so bile uporabljene
	Dejavnosti pred izpostavljenostjo (faza uravnoteženja) je treba časovno načrtovati ob upoštevanju lastnosti preskusne snovi. Če je potrebno, 7-dnevno kondicioniranje pripravljene usedline v vodi nad usedlino pri 20 ± 2 °C; v tem primeru zgodnja priprava usedline!
	Dejavnosti, opisane za 2. dan, je treba izvajati vsak dan (vsaj ob delavnikih).

▼**M6**

(b) **Faza izločanja**

Dan	Dejavnosti
– 6	priprava šotne suspenzije za usedlino; 48-urno kondicioniranje suspenzije
– 4	premešanje vseh sestavin usedline; odstranitev vzorcev usedline iz tretiranih vzorcev in usedline iz kontrole s topilom za določitev koncentracije preskusne snovi; dodajanje vode nad usedlino; inkubacija pri preskusnih pogojih
0 (28. dan faze absorpcije)	meritev kakovosti vode (glej odstavek 52); prenos črvov in preostalih izpostavljenih ponovitev v posode s čisto usedlino; po **4–6 urah** odstranitev ponovitev za odvzem vzorcev vode, usedline in črvov za določitev koncentracije preskusne snovi, naključna razporeditev črvov v preskusne komore
1	odstranitev ponovitev za vzorčenje, nadzor dovajanja zraka, obnašanja črvov in kakovosti vode (glej odstavek 52), odvzem vzorcev vode, usedline in črvov za določitev koncentracije preskusne snovi
2	nadzor dovajanja zraka, obnašanja črvov in temperature
3	enako kot 1. dan
4	enako kot 2. dan
5	enako kot 1. dan
6	enako kot 2. dan
7	enako kot 1. dan; po potrebi nadomestitev izhlapele vode
8–9	enako kot 2. dan
10	enako kot 1. dan; konec faze izločanja; meritev kakovosti vode (glej odstotek 52), vzorčenje vode, usedline in črvov iz kontrol s topilom; vzorčenje raztopin za lovljenje, če so bile uporabljene
	Usedlino pred začetkom faze izločanja je treba pripraviti enako kot pred fazo absorpcije.
	Dejavnosti, opisane za 2. dan, je treba izvajati vsak dan (vsaj ob delavnikih).

▼**M6**

Dodatek 4

Nekatere fizikalno-kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje

SESTAVINA	KONCENTRACIJE
delci	< 20 mg/l
skupni organski ogljik	< 2 µg/l
neionizirani amoniak	< 1 µg/l
ostanek klora	< 10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in polikloririrani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l

SESTAVA PRIPOROČENE MODELNE RAZREDČEVALNE VODE

(a) Raztopina kalcijevega klorida

V deionizirani vodi se raztopi 11,76 g $CaCl_2$ $2H_2O$; deionizirana voda se dolije do 1 litra.

(b) Raztopina magnezijevega sulfata

V deionizirani vodi se raztopi 4,93 g $MgSO_4$ $7H_2O$; deionizirana voda se dolije do 1 litra.

(c) Raztopina natrijevega bikarbonata

V deionizirani vodi se raztopi 2,59 g $NaHCO_3$; deionizirana voda se dolije do 1 litra.

(d) Raztopina kalijevega klorida

V deionizirani vodi se raztopi 0,23 g KCl; deionizirana voda se dolije do 1 litra.

Vse kemikalije morajo biti analitsko čiste.

Prevodnost destilirane ali deionizirane vode ne sme preseči 10 μScm^{-1}.

Zmeša se 25 ml vsake raztopine od (a) do (d), deionizirana voda pa se dolije do skupne prostornine 1 l. Vsota kalcijevih in magnezijevih ionov v tej raztopini je 2,5 mmol/l.

Razmerje ionov Ca in Mg je 4: 1 ter ionov Na in K 10: 1. Kislinska zmogljivost $K_{S4,3}$ te raztopine je 0,8 mmol/l.

Voda za redčenje se prezračuje, dokler se ne doseže nasičenost s kisikom, nato se za približno dva dni shrani brez dodatnega prezračevanja pred uporabo.

pH sprejemljive vode za redčenje mora biti v razponu 6–9.

▼M6

Dodatek 5

Umetna usedlina – priporočila za pripravo in shranjevanje

V nasprotju z zahtevami iz preskusne metode C.8 (40) je priporočena vsebnost šote v umetni usedlini 2 % namesto 10 % suhe teže, da ustreza nizki do zmerni vsebnosti organskih snovi naravnih usedlin (58).

Delež suhih sestavin umetne usedline:

Sestavina	Značilnosti	% suhe usedline
šota	šotni mah, stopnja razgradnje: „srednja“, sušen na zraku, brez vidnih ostankov rastlin, fino drobljen (velikost delcev ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
kremenov pesek	velikost zrn: ≤ 2 mm, vendar mora biti > 50 % delcev v razponu 50–200 μm	76
kaolinska glina	vsebnost kaolinita ≥ 30 %	22 ± 1
vir hrane	*Folia urticae*, listje *Urtica sp.* (velika kopriva) v prahu, fino mleto (velikost delcev ≤ 0,5 mm), ali zmes listja *Urtica sp.* v prahu z alfa celulozo (1: 1); v skladu s farmacevtskimi standardi, za prehrano ljudi; poleg suhe usedline	0,4–0,5 %
kalcijev karbonat	$CaCO_3$, zdrobljen v prah, kemijsko čist, poleg suhe usedline	0,05–1
deionizirana voda	prevodnost ≤ 10 μS/cm, poleg suhe usedline	30–50

Če se pričakujejo višje koncentracije amoniaka, npr. če je znano, da preskusna koncentracija zavira nitrifikacijo, bo morda koristno 50 % koprive v prahu nadomestiti s celulozo (npr. s kemijsko čistim prahom α-celuloze z velikostjo delcev ≤ 0,5 mm).

Priprava

Šota se posuši na zraku in zmelje v fin prah (velikost delcev ≤ 0,5 mm, ni vidnih ostankov rastlin). Suspenzija potrebne količine šote v prahu se pripravi z delom deionizirane vode, ki se doda suhi usedlini (za nastanek šotnega molja, ki ga je mogoče mešati, se je kot koristna prostornina vode izkazala 11,5-kratna suha teža šote (8)) s pomočjo visoko zmogljive naprave za homogenizacijo.

pH te suspenzije se s $CaCO_3$ uravna na 5,5 ± 0,5. Suspenzija se vsaj dva dni kondicionira z rahlim mešanjem pri 20 ± 2 °C, da se stabilizira pH in vzpostavi stabilna mikrobna komponenta. pH se znova izmeri in po potrebi s $CaCO_3$ uravna na 6,0 ± 0,5. Nato se vsa suspenzija umeša z drugimi suhimi sestavinami, pri čemer se upoštevajo vsi deli, uporabljeni za primešanje preskusne snovi. Preostala deionizirana voda se doda, da se dobi homogena usedlina. pH se znova izmeri in po potrebi s $CaCO_3$ uravna na 6,5 do 7,5. Če pa se pričakuje razvoj amoniaka, je lahko koristno ohraniti pH usedline pod 7,0 (npr. med 6,0 in 6,5). Odvzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in vsebnost organskega ogljika. Če se pričakuje razvoj amoniaka, se lahko umetna usedlina 7 dni kondicionira v enakih pogojih, kot vladajo v poznejšem preskusu (npr. razmerje med usedlino in vodo je 1: 4, višina plasti usedline kot v preskusnih posodah), preden se ji primeša preskusna snov, tj. prekriti jo je treba z vodo, ki mora biti prezračevana. Na koncu obdobja kondicioniranja je treba vodo nad usedlino odstraniti in zavreči. Odvzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in skupna vsebnost organskega ogljika (npr. 3 vzorci).

▼**M6**

Nato se kremenov pesek s primešano preskusno snovjo zmeša z usedlino za vsako stopnjo tretiranja, usedlina se razporedi v ponovitvene preskusne posode in prekrije s preskusno vodo (npr. razmerje med usedlino in vodo je 1: 4, višina plasti usedline v ko preskusnih posodah). Posode se nato inkubirajo v enakih pogojih kot vladajo v poznejšem preskusu. Tukaj se začne obdobje za uravnoteženje. Vodo nad usedlino je treba prezračevati.

Izbrani vir hrane je treba dodati pred primešanjem preskusne snovi v usedlino ali med njim. Na začetku se lahko zmeša s šotno suspenzijo (glej zgoraj). Čezmerna razgradnja vira hrane pred vnosom preskusnih organizmov, npr. v primeru dolgega obdobja za uravnoteženje, se lahko prepreči z ohranjanjem čim krajšega časa med dodajanjem hrane in začetkom izpostavljenosti. Da se zagotovi ustrezen stik hrane s preskusno snovjo, je treba vir hrane zmešati z usedlino najpozneje na dan primešanja preskusne snovi v usedlino. Izjeme so dovoljene, kadar dolžina obdobja za uravnoteženje povzroča mikrobno razgradnjo hrane pred vnosom preskusnih organizmov. Odvzamejo se vzorci usedline, da se določita suha teža in skupni organski ogljik (npr. 3 vzorci usedline s primešano preskusno snovjo ali kontrolne usedline).

Suho težo sestavin (šote, peska, kaolina) je treba sporočiti v gramih in deležu skupne suhe teže.

Tudi prostornino vode, ki jo je treba med pripravo usedline dodati suhim sestavinam, je treba sporočiti v deležu skupne suhe teže (npr. 100 % suhe teže + 46 % vode pomeni, da 1 000 g suhe teže sprejme skupaj 460 ml vode, kar je 1 460 g mokre usedline).

Shranjevanje

Suhe sestavine za umetno usedlino se lahko shranjujejo v suhem in hladnem prostoru pri sobni temperaturi. Pripravljena mokra usedlina se lahko za 2–4 tedne od dneva priprave hrani (le za nadaljnjo uporabo v gojišču) v temi pri 4 ± 2 °C (8).

Usedlino s primešano preskusno snovjo je treba uporabiti takoj, razen če obstajajo informacije o tem, da je mogoče določeno usedlino shranjevati, ne da bi to vplivalo na strupenost in biološko razpoložljivost preskusne snovi. Vzorci usedline s primešano preskusno snovjo se lahko do analize hranijo v pogojih, priporočenih za zadevno preskusno snov.

▼M6

Dodatek 6

Vrste maloščetincev, priporočene za preskušanje bioakumulacije

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Maloščetinski tubifeks (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) živi v sladkovodnih usedlinah v cevkah, ki so prevlečene s sluzjo. Črvi v teh cevkah živijo z glavo navzdol in se prehranjujejo z delci usedline, pri čemer izkoriščajo povezane mikro organizme in organske odpadke. Zadnji del običajno valovi v vodi nad usedlino zaradi dihanja. Čeprav ta vrsta naseljuje številne vrste usedlin po celotni severni polobli, ima *Tubifex tubifex* najraje razmeroma fine delce (59). Primernost te vrste za ekotoksikološko preskušanje je opisana na primer v (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Metode gojenja

Da se zagotovi zadostno število osebkov *Tubifex tubifex* za izvajanje preskusov bioakumulacije, bo morda treba črve gojiti v stalni laboratorijski kulturi. Za gojenje *T. tubifex* se priporoča sistem, ki zajema umetno usedlino na podlagi umetnih tal v skladu s preskusno metodo C.8 (40) in modelno razredčevalno vodo v skladu s preskusno metodo C.1 (8).

Kot posode za gojenje se lahko uporabijo posode iz stekla ali nerjavnega jekla višine od 12 do 20 cm. V vsaki posodi za gojenje je plast mokre umetne usedline, pripravljene, kot je opisano v Dodatku 5. Debelina plasti usedline mora omogočati naravno obnašanje črvov pri zarivanju (vsaj 2 cm debela plast za *T. tubifex*). V sistem se doda modelna razredčevalna voda. Pri tem je treba paziti, da se usedlina čim manj moti. Vodno telo se nežno prezračuje (npr. 2 mehurčka na sekundo z zrakom, filtriranim na 0,45 μm) s pasteurjevo pipeto, ki je nastavljena 2 cm nad površino usedline. Priporočena temperatura za gojenje je 20 ± 2 °C.

Črvi se v sistem za gojenje vnesejo z največjo obremenitvijo 20 000 osebkov/m^2 površine usedline. Večja obremenitev bi lahko povzročila manjše hitrosti rasti in razmnoževanja (43).

Pri gojenju v umetnih usedlinah je treba črve hraniti. Prehrana, ki zajema fino mleto ribjo hrano, npr. TetraMin®, lahko služi kot dodatna hranilna snov (8); Klerks 1994, osebno sporočilo. Stopnje hranjenja morajo omogočati zadostno rast in razmnoževanje ter ohranjati kopičenje amoniaka in rast plesni v gojišču na čim nižji ravni. Hrana se lahko daje dvakrat na teden (npr. 0,6–0,8 mg/cm^2 površine usedline). Praktične izkušnje so pokazale, da lahko uporaba hrane, ki je suspendirana in homogenizirana v deionizirani vodi, olajša homogeno razporeditev hrane po površini usedline v posodah za gojenje.

Da se prepreči kopičenje amoniaka, je treba vodo nad usedlino zamenjati s pretočnim sistemom ali ročno vsaj enkrat na teden. V založnih kulturah je treba usedlino zamenjati vsake tri mesece.

Vzorčenje črvov iz gojišča se lahko izvede s presejanjem gojitvene usedline skozi sito z luknjicami velikosti 1 mm, če so potrebni le odrasli osebki. Za zadržanje kokonov je primerna mreža z luknjicami velikosti 0,5 mm, za črvje mladiče pa sito z luknjicami velikosti 0,25 mm. Ko se usedlina preseje skozi sita, se ta lahko postavijo v modelno razredčevalno vodo. Črvi zapustijo mrežo in se lahko nato iz vode poberejo s prijemalkami iz plavljenega jekla ali pipeto z vroče poliranimi robovi.

▼M6

Za začetek preskusa ali novih kultur se uporabijo samo nepoškodovani in jasno identificirani primerki *Tubifex tubifex* (npr. (64)). Bolne ali poškodovane črve in kokone, na katerih so se namnožili mikroorganizmi *fungus hypha*, je treba zavreči.

S sinhrono kulturo se lahko v primernih razmikih zagotovijo črvi določene starosti, ko so potrebni. Nove posode za gojenje se pripravijo v izbranih razmikih (npr. vsaka dva tedna), pri čemer se začnejo z živalmi določene starosti (npr. kokoni). V pogojih gojenja, opisanih tukaj, črvi odrastejo po 8–10 tednih. Kulture se lahko spravijo, ko črvi odložijo nove kokone, npr. po desetih tednih. Vzorčeni odrasli osebki se lahko uporabijo za preskuse, s kokoni pa se lahko začnejo nove kulture.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) prav tako živi v sladkovodnih usedlinah po vsem svetu in se pogosto uporablja v ekotoksikološkem preskušanju. Informacije o biologiji, pogojih gojenja in občutljivosti vrste so navedene v (1) (6) (9) (36). *Lumbriculus variegatus* se lahko z nekaj omejitvami gojijo tudi v umetni usedlini, ki se v skladu z (8) priporoča za *T. tubifex*. Ker ima *L. variegatus* v naravi raje bolj grobe usedline kot *T. tubifex* (59), lahko laboratorijske kulture v umetnih usedlinah, ki se uporabljajo za *T. tubifex*, poginejo po 4 do 6 mesecih. Praktične izkušnje so pokazale, da je lahko *L. variegatus* v peščenem substratu (npr. kremenov pesek, fini prod) v pretočnem sistemu, v katerem se ribja hrana uporablja kot vir hranilnih snovi več let brez obnovitve substrata. Velika prednost *L. variegatus* pred drugimi vrstami vodnih maloščetincev je hitro razmnoževanje, zaradi katerega se biomasa v laboratorijsko gojenih populacijah hitro poveča (1) (6) (9) (10).

Metode gojenja

Pogoji gojenja za *Lumbriculus variegatus* so podrobno opisani v Phipps in drugi (1993) (10), Brunson in drugi (1998) (28), ASTM (2000) (1) in U.S. EPA (2000) (6). V nadaljevanju je naveden kratek povzetek teh pogojev.

Črvi se lahko gojijo v velikih akvarijih (57–80 l) pri 23 °C z obdobjem osvetljenosti (100–1 000 luksov), ki obsega 16 ur svetlobe in 8 ur teme, ter vsakodnevno obnovljeno naravno vodo (45–50 l na akvarij). Substrat se pripravi z rezanjem nebeljenih brisač iz rjavega papirja na trakove, ki se lahko nato nekaj sekund meša z vodo za gojenje, da nastanejo majhni kosi papirnega substrata. Ta substrat se lahko nato neposredno uporabi v akvariju s kulturo *Lumbriculus*, tako da se prekrije dno posode, ali pa se za poznejšo uporabo shrani zamrznjen v deionizirani vodi. Nov substrat v posodi bo na splošno zdržal približno dva meseca.

Vsaka kultura črvov se začne s 500–1 000 črvi in se trikrat na teden hrani z 10 ml suspenzije, ki vsebuje 6 g začetne hrane za postrvi, v pogojih za obnovitev ali pretočnih pogojih. Statičnim ali polstatičnim kulturam se morajo zagotoviti manjše stopnje hranjenja, da se prepreči rast bakterij in plesni. Hrano in papirni substrat je treba analizirati glede snovi, ki jih je treba uporabiti v preskusih bioakumulacije.

V teh pogojih se število osebkov v kulturi običajno podvoji v približno 10 do 14 dneh.

Lumbriculus variegatus se lahko odstrani iz gojišč npr. s prenosom substrata s fino mrežo ali organizmov z vroče polirano široko (premer približno 5 mm) stekleno pipeto v ločeno čašo. Če se v to čašo prenese tudi substrat, se čaša s črvi in substratom čez noč pusti v pretočnih pogojih, v katerih se bo substrat odstranil iz čase, medtem ko bodo črvi ostali na dnu posode. Nato se lahko

▼M6

vnesejo v novo pripravljene posode za gojenje ali dodatno obdelajo za preskus, kot je opisano v (1) in (6). Poškodbe ali avtotomijo pri črvih je treba preprečiti npr. z uporabo pipet z vroče poliranimi robovi ali nerjavnimi pincetami za ravnanje s temi črvi.

Pri uporabi *L. variegatus* v preskusih bioakumulacije v usedlinah je treba kritično obravnavati njihov način razmnoževanja (arhitomija, ki ji sledi morfalaksa). S tem nespolnim razmnoževanjem nastaneta dva fragmenta, ki se določeno časovno obdobje ne prehranjujeta, dokler se glava ali del repa ne obnovi (npr. (36) (37)). To pomeni, da je pri *L. variegatus* absorpcija usedline in onesnaževala z zaužitjem morda ne odvijata hkrati, kot pri tubificidih, ki se ne razmnožujejo s fragmentacijo.

Zato je treba izvesti sinhronizacijo, da se čim bolj zmanjšata nenadzorovano razmnoževanje in obnavljanje ter s tem velike razlike v rezultatih preskusov. Do takih razlik lahko pride, če so nekateri osebki, ki so se fragmentirali in se zato določeno časovno obdobje niso prehranjevali, manj izpostavljeni preskusni snovi kot drugi osebki, ki se med preskusom ne fragmentirajo, npr. (38). Črve je treba 10 do 14 dni pred začetkom izpostavljenosti umetno fragmentirati (sinhronizacija) (65). Uporabiti je treba velike črve, ki po možnosti ne kažejo znakov nedavne fragmentacije. Ti črvi se lahko postavijo na objektno stekelce v kapljico vode za gojenje in s skalpelom secirajo po sredini telesa. Pri tem je treba paziti, da so zadnji deli podobne velikosti. Nato je treba zadnje dele do začetka izpostavljenosti pustiti v posodah za gojenje z istim substratom, kot je bil uporabljen v vodi za gojenje in modelni razredčevalni vodi, kjer se regenerirajo nove glave. Regeneracija novih glav se kaže, ko se sinhronizirani črvi zarijejo v substrat (prisotnost regeneriranih glav se lahko potrdi s pregledom reprezentativnega podvzorca pod binokularnim mikroskopom). Preskusni organizmi se nato pregledajo, da so v podobnem fiziološkem stanju. To pomeni, da se pričakuje, da bodo vse živali enako izpostavljene usedlini s primešano preskusno snovjo, ko se med preskusom pri sinhroniziranih črvih pojavi regeneracija z morfalakso. Sinhronizirane črve je treba hraniti takoj, ko se začnejo zarivati v substrat, ali 7 dni po seciranju. Način hranjenja mora biti primerljiv z navadnimi kulturami, vendar bi se lahko sinhronizirani črvi hranili z enakim virom hrane kot se uporabi v preskusu. Črve je treba shranjevati pri preskusni temperaturi, tj. 20 ± 2 °C. Po regeneraciji je treba za preskus uporabiti nepoškodovane in popolne črve podobne velikosti, ki aktivno plavajo ali se plazijo po nežnih mehanskih dražljajih. Poškodbe ali avtotomijo pri črvih je treba preprečiti npr. z uporabo pipet z vroče poliranimi robovi ali nerjavnimi pincetami za ravnanje s temi črvi.

Kadar se v preskusu uporabi *Lumbriculus variegatus*, se mora zaradi specifičnega načina razmnoževanja te vrste število črvov med preskusom povečati, če so pogoji ustrezni (6). Odsotnost razmnoževanja v preskusu bioakumulacije z *L. variegatus* je treba zabeležiti in upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (vrsta ni validirana s krožnim preskusom)**

Branchiura sowerbyi naseljujejo različne vrste usedlin v zajetjih, jezerih, ribnikih in rekah, avtohtono v tropskih območjih. Nahajajo se lahko tudi v toplih vodnih telesih severne poloble. Vendar so pogostejši v blatnih glinenih usedlinah z

▼M6

visoko vsebnostjo organske snovi. Črvi živijo v plasti usedline. Običajno je zarit tudi zadnji del črvov. Ta vrsta se enostavno identificira po škržnih lističih na zadnjem delu. Odrasli osebki lahko v dolžino dosežejo 9–11 cm, njihova mokra teža pa je 40–50 mg. Črvi se hitro razmnožujejo, pri čemer se njihovo število v temperaturnih pogojih in pogojih prehranjevanja, opisanih v nadaljevanju, podvoji v manj kot 2 tednih (Aston in drugi, 1982, (65)). *B. sowerbyi* se uporablja tako v študijah strupenosti kot v študijah bioakumulacije (Marchese in Brinkhurst 1996 (31), Roghair in drugi 1996 (67)).

Metode gojenja

V nadaljevanju so povzeti pogoji gojenja *Branchiura sowerbyi* (po Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina in Carla J. Roghair, RIVM, Nizozemska).

Za gojenje preskusnih organizmov se ne zahteva enotna tehnika. Organizmi se lahko gojijo v neonesnaženi naravni usedlini (31). Praktične izkušnje so pokazale, da se z gojiščem iz naravne usedline in peska izboljša stanje črvov v primerjavi s čisto naravno usedlino (32) (67). Za to kulturo se lahko uporabijo čaše s prostornino 3 l, v katerih je 1 500 ml gojišča iz usedline in vode, ki vsebuje 375 ml naravne neonesnažene usedline (približno 10 % skupnega organskega ogljika, približno 17 % delcev ≤ 63 μm), 375 ml čistega peska (M32) in 750 ml modelne razredčevalne vode ali deklorirane vodovodne vode (31) (32) (67). Kot substrat za gojenje se lahko uporabijo tudi papirnate brisače, vendar je rast populacije manjša kot v naravni usedlini. V polstatičnih sistemih se vodna plast počasi prezračuje, vodo nad usedlino pa je treba obnoviti vsak teden.

V vsaki čaši je na začetku 25 mladih črvov. Po dveh mesecih se veliki črvi s pinceto poberejo iz usedline in vnesejo v novo čašo s sveže pripravljenim gojiščem iz usedline in vode. V stari čaši so tudi kokoni in mladi črvi. Tako se lahko spravi do 400 mladih črvov na čašo. Odrasli črvi se lahko vsaj eno leto uporabljajo za razmnoževanje.

Kulture je treba vzdrževati pri temperaturi 21 do 25 °C. Temperatura ne sme nihati za več kot ± 2 °C. Čas, potreben za razvoj embria od odložitve jajčeca do mladiča, ki zapusti kokon, je približno tri tedne pri 25 °C. Ugotovljeno je bilo, da je pri *B. sowerbyi* en preživeli črv v blatu pri 25 °C proizvede od 6,36 (31) do 11,2 (30) jajčec na preživelega črva. Število jajčec na kokon je od 1,8 do 2,8 (66) (69) ali do 8 (68).

Vsak teden je treba izmeriti raztopljeni kisik, trdoto vode, temperaturo in pH. Ribja hrana (npr. TetraMin®) se lahko doda kot suspenzija dvakrat ali trikrat na teden *ad libitum*. Črvi se lahko *ad libitum* hranijo tudi z odtajano zeleno solato.

Pomembna prednost te vrste je velika biomasa osebkov (do 40–50 mg mokre teže na osebek). Zato se lahko ta vrsta uporablja za preskušanje bioakumulacije neradioaktivno označenih preskusnih snovi. Izpostavi se lahko v sistemih, ki se uporabljajo za *T. tubifex* ali *L. variegatus*, z enim osebkom na ponovitev (11). Vendar je nato treba ponovitev povečati, razen če se uporabijo večje preskusne komore (11). Za to vrsto je treba prilagoditi tudi merilo za veljavnost v zvezi z obnašanjem med zarivanjem.

▼**M6**

LITERATURA

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. V: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Zvezek 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Urad za publikacije Evropskih skupnosti, Luksemburg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), Pariz.

(4) Ingersoll, C. G., Ankley, G. T., Benoit D. A., Brunson, E. L., Burton, G. A., Dwyer, F. J., Hoke, R. A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J., in Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885–1894.

(5) Poglavje C.13 te priloge, Biokoncentracija: pretočni preskus na ribah.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Druga izdaja. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

(7) Poglavje C.27 te priloge, Preskus strupenosti s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo usedline s primešano preskusno snovjo.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G., in Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835–852.

(9) Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Wang N., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Mount D. R., Huckins J., Petty. J., in Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885.

(10) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., in Mattson, V. R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., in Studinger, G. (1999). Delavnica o „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.–27.april 1999, Hochheim am Main, Nemčija. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., in Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J. R., Levine, S. N., Buttel, L. A., Kelly, A. C., Rudnick, D. T., in Morton, R. D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301–310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. V: R. Nagel in R. Loskill (ur.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim.

(15) Landrum, P. F., Lee II, H., in Lydy, M. J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709–1725.

(16) Markwell, R. D., Connell, D. W., in Gabric, A. J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443–1450.

(17) Gabric, A. J., Connell, D. W., in Bell, P. R. F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225–1231.

(18) Kukkonen, J., in Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., in Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501–1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Naslednja poglavja te priloge:

Poglavje A.4, Parni tlak,

Poglavje A.5, Površinska napetost,

Poglavje A.6, Topnost v vodi,

Poglavje A.8, Porazdelitveni koeficient, metoda stresanja bučke,

Poglavje A.24, Porazdelitveni koeficient, metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC),

Poglavje C.7, Razgradnja – Abiotska razgradnja: hidroliza kot funkcija pH,

Poglavje C.4 A–F, Določanje „dobre“ biorazgradljivosti,

Poglavje C.19, Ocenjevanje adsorpcijskega koeficienta (K_{oc}) tal in odpadnega blata (blata iz čistilnih naprav) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC),

Poglavje C.29, Dobra biorazgradljivost – CO_2 v zaprtih posodah.

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Pariz.

(24) Antoine, M. D., Dewanathan, S., in Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165–172.

▼M6

(25) Beek, B., Boehling, S., Bruckmann, U., Franke, C., Joehncke, U., in Studinger, G. (2000). The assessment of bioaccumulation. V: Hutzinger, O. (ur.), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (ur. zvezka: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

(26) Spacie, A., in Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

(27) Hawker, D. W., in Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701–707.

(28) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J., in Kemble, N. E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201.

(29) Reynoldson, T. B., Thompson, S. P., in Bamsey, J. L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061–1072.

(30) Aston, R. J., in Milner, A. G. P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155–160.

(31) Marchese, M. R., in Brinkhurst, R. O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163–168.

(32) Roghair, C. J., in Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Poglavje C.1 te priloge, Akutna strupenost za ribe.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariz.

(35) Kaster, J. L., Klump, J. V., Meyer, J., Krezoski, J., in Smith, M. E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181–184.

(36) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194.

(37) Leppänen, M. T., in Kukkonen, J. V. K. (1998). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202.

(38) Leppänen M. T., in Kukkonen J. V. K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503–1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J. I., in Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111–124.

▼**M6**

(40) Poglavje C.8 te priloge, Strupenost za deževnike.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588–595.

(43) Poddubnaya, T. L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). V: R. O. Brinkhurst in D. G. Cook (ur.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175–184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391–94.

(45) Hooftman, R. N., van de Guchte, K., in Roghair, C. J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897–1905.

(47) Mount, D. R., Dawson, T. D., in Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244–1249.

(48) Randall, R. C., Lee II, H., Ozretich, R. J., Lake, J. L., in Pruell, R. J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431–1436.

(49) Gardner, W. S., Frez, W. A., Cichocki, E. A., in Parrish, C. C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099–1105.

(50) Bligh, E. G., in Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D., in Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Danska.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W., in Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411–421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Nemčija.

(55) Janssen, M. P. M., Bruins, A., De Vries, T. H., in Van Straalen, N. M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

(56) Van Brummelen, T. C., in Van Straalen, N. M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N. A., Verkade, S. K., Van Gestel, C. A. M., in Van Straalen, N. M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

(58) Suedel, B. C., in Rodgers, J. H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163–1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310–386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785–790.

(61) Chapman, P. M., Farrell, M. A., in Brinkhurst, R. O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47–67.

(62) Chapman, P. M., Farrell, M. A., in Brinkhurst, R. O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69–78.

(63) Rodriguez, P., in Reynoldson, T. B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. V: A. Mudroch, J. M. Azcue, in P. Mudroch (ur.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R. O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., in Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R. J., Sadler, K., in Milner, A. G. P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137–145.

(67) Roghair, C. J., Buijze, A., Huys, M. P. A., Wolters-Balk, M. A. H., Yedema, E. S. E., in Hermens, J. L. M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R. J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89–94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G., in Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267–274.

▼M7

C.47 RIBE, PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA ZGODNJE RAZVOJNE STOPNJE

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 210 (2013). Preskusi zgodnjih razvojnih stopenj rib so namenjeni opredelitvi letalnih in subletalnih učinkov kemikalij na stopnje in vrste rib, ki se preskušajo. So pomemben vir informacij za oceno kroničnih letalnih in subletalnih učinkov kemikalije na druge vrste rib.

2. Smernica za preskušanje št. 210 temelji na predlogu Združenega kraljestva, ki je bil obravnavan na srečanju strokovnjakov OECD v Medmenhamu (Združeno kraljestvo) novembra 1988 in posodobljen leta 2013, da bi odražal izkušnje pri uporabi preskusa in priporočila z delavnice OECD o preskušanju toksičnosti za ribe, ki je potekala septembra 2010 (1).

NAČELO PRESKUSA

3. Ribe so v zgodnjih razvojnih stopnjah izpostavljene različnim koncentracijam preskusne kemikalije, raztopljene v vodi. Če je mogoče, se uporabijo pretočni pogoji; če to ni mogoče, so sprejemljivi tudi polstatični pogoji. Za podrobnosti glej dokument s smernicami OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi za vodno okolje (2). Preskus se začne tako, da se oplojene ikre vstavijo v preskusne komore, kjer ostanejo toliko časa, kolikor je potrebnega, da kontrolne ribe te vrste dosežejo življenjsko stopnjo mladice. Ocenijo se letalni in subletalni učinki ter se primerjajo s kontrolnimi vrednostmi za določitev najnižje koncentracije z opaženim učinkom (LOEC) ter za posledično določitev (i) koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) in/ali (ii) EC_x (npr. EC_{10}, EC_{20}) z regresijskim modelom, s katerim se oceni koncentracija, ki bi povzročila x-odstotno spremembo izmerjenega učinka. Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Preskusne koncentracije bi morale oklepati vrednost EC_x, tako da vrednost EC_x nato izvira iz interpolacije in ne iz ekstrapolacije (za opredelitev pojmov glej Dodatek 1).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

4. Preskusna kemikalija je kemikalija, ki se preskuša. Poznati je treba topnost v vodi (glej poglavje A.6 te priloge) in parni tlak (glej poglavje A.4 te priloge), na voljo pa mora biti tudi zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo kemikalije v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo določljivosti. Čeprav preskus ni obvezen, lahko rezultati preskusa akutne toksičnosti (glej poglavji C.1 in C.49 te priloge), po možnosti izvedenega z vrstami, izbranimi za ta preskus, zagotovijo koristne informacije.

5. Če se preskusna metoda uporablja za preskušanje zmesi, mora biti njena sestava v čim večji meri opredeljena, npr. s kemijsko identiteto sestavin, kvantitativnim pojavljanjem in specifičnimi lastnostmi snovi (kot so tiste, navedene zgoraj). Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.

6. Druge uporabne informacije so strukturna formula, čistost snovi, topnost v vodi, stabilnost v vodi in na svetlobi, pK_a, P_{ow} ter rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (npr. poglavji C.4 in C.29 te priloge).

▼M7

VELJAVNOST PRESKUSA

7. Za veljavnost preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom večja od 60 % nasičenosti z zrakom,

— razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih komorah ali v zaporednih dneh med preskusom nikoli ne sme biti večja od ±1,5 °C in jo je treba ohranjati znotraj temperaturnih območij, določenih za preskusno vrsto (Dodatek 2),

— obvezna je analitska meritev preskusnih koncentracij,

— število vseh preživelih oplojenih iker ter preživetje po izvalitvi v kontrolah in, kadar je primerno, v kontrolah s topilom mora biti večje ali enako mejnim vrednostim iz Dodatka 2.

8. Če se opazi manjše odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost preskusnih podatkov in ta obravnavanja vključiti v poročilo. Poročati je treba o učinkih na preživetje, izvalitev ali rast v kontroli s topilom v primerjavi z negativno kontrolo ter jih obravnavati glede na zanesljivost preskusnih podatkov.

OPIS METODE

Preskusne komore

9. Uporabijo se lahko kakršne koli steklene, nerjavne ali druge kemijsko inertne posode. Ker je znano, da silikon zelo dobro absorbira lipofilne snovi, je treba uporabo silikonskih cevi pri študijah s pretočnimi postopki in uporabo silikonskih tesnil pri stiku z vodo čim bolj omejiti npr. z uporabo steklenih akvarijev iz enega kosa. Posode morajo biti dovolj velike, da omogočajo ustrezno rast v kontroli, vzdrževanje koncentracije raztopljenega kisika (npr. za majhne vrste rib to zagotavlja posoda s prostornino 7 litrov) in skladnost s stopnjo obremenitve iz odstavka 19. Priporočljivo je, da se preskusne komore naključno postavijo v preskusno območje. Bolj kot povsem naključna zasnova se priporoča zasnova naključne razdelitve v bloke, pri kateri se v vsakem bloku izvedejo vsa tretiranja. Preskusne komore morajo biti zaščitene pred neželenimi motnjami. Preskusni sistem mora biti po možnosti dovolj dolgo izpostavljen koncentracijam preskusne kemikalije, da pred vnosom preskusnih organizmov dokaže stabilnost koncentracij za izpostavljanje.

Izbira vrst

10. Priporočene vrste rib so navedene v preglednici 1. To ne izključuje uporabe drugih vrst, vendar bo morda treba temu prilagoditi preskusni postopek, da se zagotovijo primerni preskusni pogoji. V tem primeru je treba utemeljiti izbiro vrste in preskusne metode.

Vzdrževanje plemenskih rib

11. Podrobnosti o vzdrževanju plemenskih rib v zadovoljivih pogojih lahko najdemo v Dodatku 3 in v virih (3) (4) (5).

Ravnanje z oplojenimi ikrami, zarodki in ličinkami

12. Oplojene ikre, zarodki in ličinke se lahko na začetku izpostavijo v glavni posodi v manjših steklenih ali posodah iz nerjavnega jekla, ki imajo

▼M7

mrežaste stranice ali konce, da se lahko skozi posodo pretaka preskusna raztopina. Neturbulentni tok skozi te majhne posode se lahko doseže tako, da se posode obesijo na držalo, nameščeno tako, da premika posodo gor in dol, vendar tako, da so organizmi ves čas potopljeni. Oplojene ikre salmonidnih rib lahko ležijo na podstavkih ali mrežah z dovolj velikimi luknjicami, da lahko ličinke, ko se izležejo, padejo skoznje.

13. Kadar se za zadrževanje iker v glavni preskusni posodi uporabljajo posodice, rešetke ali mreže za ikre, je treba te priprave, ko se ličinke izležejo, odstraniti v skladu s smernicami iz Dodatka 3, obdržijo se le mreže, da ličinke ne pobegnejo. Če je treba ličinke prenesti, se te ne smejo izpostaviti zraku in pri spuščanju ličink iz posod za ikre se ne smejo uporabljati lovilne mrežice. Čas prenosa je različen glede na vrsto in ga je treba zapisati v poročilo. Prenos pa ni vedno nujno potreben.

Voda

14. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri preskusna vrsta dokaže sposobnost primernega dolgotrajnega preživetja in rasti (glej Dodatek 4). Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmikih jemati vzorce za analizo. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (e.g. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), amonijaka, skupnih preostalih klornih pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti na primer dvakrat letno, kadar je voda za redčenje po svoji kakovosti relativno konstantna. Če je znano, da je kakovost vode spremenljiva, je treba meritve izvajati pogosteje; pogostost je odvisna od tega, kako spremenljiva je kakovost. Nekatere kemijske lastnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 4.

Preskusne raztopine

15. Za pretočne preskuse je potreben sistem, ki stalno odmerja in redči osnovno raztopino preskusne kemikalije (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik, sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba med preskusom preverjati v časovnih razmikih in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Ugotovljeno je bilo, da je primeren pretok enak prostornini vsaj petih preskusnih komor na 24 ur (3). Ob upoštevanju stopnje obremenitve iz odstavka 19 je za preprečitev hitre odstranitve hrane mogoče uporabiti tudi manjši pretok, npr. 2–3 preskusne komore.

16. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine ali metode pasivnega odmerjanja (6). Uporaba topila kot nosilca ni priporočljiva. Če je topilo potrebno, je treba vzporedno izvajati kontrolo s topilom z enako koncentracijo topila kot pri tretiranjih s kemikalijo; odmerek topila bi moral biti po možnosti enak pri vseh koncentracijah in pri kontroli s topilom. Pri nekaterih sistemih razredčevalnikov je to tehnično težko izvedljivo; pri njih mora biti koncentracija topila pri kontroli s topilom enaka najvišji koncentraciji topila v tretirani skupini. Za snovi, ki jih je težko preskušati, glej Dokument s smernicami OECD št. 23 za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi za vodno okolje (2). Če se

▼M7

uporabi topilo, se izbere na podlagi kemijskih lastnosti snovi. V skladu z Dokumentom s smernicami OECD št. 23 se priporoča največja koncentracija 100 µl/l. Da bi se izognili možnemu učinku topila na izmerjene končne točke (7), se priporoča čim nižja koncentracija topila.

17. Za polstatični preskus se lahko uporabita dva različna postopka obnove. Bodisi se pripravijo nove preskusne raztopine v čistih posodah ter se preživele ikre in ličinke nežno prenesejo v nove posode bodisi preskusni organizmi ostanejo v preskusnih posodah, medtem ko se zamenja del (vsaj dve tretjini) preskusne raztopine/prostornine kontrole.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

18. Preskus je treba začeti čim prej po tem, ko se ikre oplodijo in se po možnosti potopijo v preskusne raztopine pred začetkom brazdanja blastodiska, ali čim prej po tej stopnji. Trajanje preskusa bo odvisno od uporabljene vrste. Nekatera priporočena trajanja so navedena v Dodatku 2.

Obremenitev

19. Število oplojenih iker mora biti na začetku preskusa dovolj veliko, da izpolnjuje statistične zahteve. Ikre je treba naključno porazdeliti med tretiranja in za vsako koncentracijo je treba uporabiti vsaj 80 iker, ki morajo biti enakomerno porazdeljene med vsaj štiri ponovitvene preskusne komore. Stopnja obremenitve (biomasa na prostornino preskusne raztopine) mora biti dovolj nizka, da se lahko v razvojni stopnji ikre in ličinke brez prezračevanja ohranja koncentracija raztopljenega kisika, ki znaša vsaj 60 % nasičenosti z zrakom. Za pretočne preskuse je priporočena stopnja obremenitve, ki nikoli ne presega 0,5 g/l mokre teže na 24 ur in ne presega 5 g/l raztopine (3).

Svetloba in temperatura

20. Obdobje osvetljenosti in temperatura vode morata biti ustrezna za preskusno vrsto (glej Dodatek 2).

Hranjenje

21. Hrana in hranjenje sta ključna, zato je bistveno, da se pravilna hrana za posamezno življenjsko stopnjo dovaja v ustreznem trenutku in v količini, ki je ustrezna za normalno rast. Hranjenje mora biti med različnimi ponovljenimi vzorci približno enako, razen če se ne prilagodi zaradi smrtnosti. Ostanke hrane in iztrebke je treba odstraniti, da se prepreči kopičenje odpadkov. Načini hranjenja so podrobno opisani v Dodatku 3, vendar se s pridobljenimi izkušnjami hrana in načini hranjenja stalno izpopolnjujejo, da se izboljšata preživetje in rast. Z živo hrano se bogati okolje, zato jo je treba uporabljati namesto suhe ali zamrznjene hrane ali kot njen dodatek vedno, ko to omogočata vrsta in razvojna stopnja.

Preskusne koncentracije

22. Običajno je potrebnih pet koncentracij preskusne kemikalije z najmanj štirimi ponovljenimi vzorci na koncentracijo, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ni večji od 3,2. Če so na voljo informacije o preskušanju akutne toksičnosti, po možnosti z istimi vrstami in/ali preskusom za določanje območja delovanja, jih je treba upoštevati (1) pri izbiri območja preskusnih koncentracij. Pri izbiri območja preskusnih koncentracij je treba upoštevati vse vire informacij, vključno z viri, kot so navzkrižno branje ali podatki preskusa akutne toksičnosti za ribji zarodek. Kadar je treba določiti le empirične NOEC, je kot končni preskus lahko

▼M7

sprejemljiv mejni preskus ali podaljšani mejni preskus z manj kot petimi koncentracijami. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Koncentracij preskusne kemikalije, ki so višje od LC_{50} po 96 urah ali 10 mg/l, katera koli je nižja, ni treba preskušati.

Kontrole

23. Poleg niza koncentracij preskusne kemikalije je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje in po potrebi kontrolo s topilom, ki kot nosilec vključuje le topilo (glej odstavek 16).

Pogostost analitskega določanja in meritev

24. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba pri vseh ponovljenih vzorcih zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije (na primer z meritvijo preskusnih koncentracij). Vzpostaviti je treba analitske metode, vključno z ustrezno mejo določljivosti (LOQ) in zadostnim znanjem o stabilnosti snovi v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določijo v rednih časovnih razmikih za opredeljevanje izpostavljenosti. Potrebnih je najmanj pet določitev. Pri pretočnih sistemih je treba vsaj enkrat tedensko izvesti analitske meritve preskusne kemikalije pri enem ponovljenem vzorcu na koncentracijo, pri čemer je treba ponovljene vzorce sistematično menjavati. Dodatne analitske določitve pogosto izboljšajo kakovost rezultatov preskusa. Vzorce bo morda treba filtrirati (npr. skozi pore, velike 0,45 μm), da se odstranijo delci, ali centrifugirati, da se zagotovijo določitve kemikalije v dejanski raztopini. Za zmanjšanje adsorpcije preskusne kemikalije je treba zagotoviti, da so filtri pred uporabo nasičeni. Če izmerjene koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije, je treba koncentracije z učinkom pri pretočnih preskusih določiti in izraziti glede na aritmetično sredino koncentracij (za izračun aritmetične sredine (8) glej Dodatek 6 k preskusni metodi C.20), pri polstatičnih preskusih pa izraziti glede na geometrijsko sredino izmerjenih koncentracij (glej poglavje 5 Dokumenta s smernicami OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi za vodno okolje (2)).

25. Med preskusom je treba raztopljeni kisik, pH in temperaturo v vseh preskusnih posodah meriti vsaj enkrat tedensko, slanost in trdoto, če je to upravičeno, pa na začetku in koncu preskusa. Temperatura se po možnosti stalno spremlja v vsaj eni preskusni posodi.

Opazovanja

26. **Stopnje razvoja zarodka**: embrionalno stopnjo na začetku izpostavljenosti preskusni kemikaliji je treba čim natančneje preveriti. To se lahko naredi z uporabo reprezentativnega vzorca iker, ki so primerno konzervirane in očiščene.

27. **Izvalitev in preživetje**: vsaj enkrat na dan je treba opazovati izvalitev in preživetje ter zapisati vrednosti. Če se v zgodnjem razvoju zarodka (na primer prvi ali drugi dan preskusa) na ikrah opazijo glive, je treba te ikre prešteti in odstraniti. Mrtve zarodke, ličinke in mladice je treba odstraniti čim prej po tem, ko se opazijo, ker se lahko hitro razkrojijo in razpadejo zaradi delovanja drugih rib. Izjemna pazljivost je potrebna pri odstranjevanju posameznih mrtvih osebkov, da se fizično ne poškodujejo sosednje ikre/ličinke. Znaki smrti se razlikujejo glede na vrsto in razvojno stopnjo. Na primer:

▼M7

— pri oplojenih ikrah: zlasti v zgodnjih stopnjah opazna izguba prosojnosti in sprememba barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz;

— pri zarodkih, ličinkah in mladicah: negibnost in/ali odsotnost dihalnega gibanja in/ali odsotnost srčnega utripa in/ali pomanjkanje odzivanja na mehanske dražljaje.

28. **Nenormalen videz**: število ličink ali mladic, pri katerih se kaže nenormalna oblika telesa, je treba zapisovati v ustreznih časovnih razmikih, ki so odvisni od trajanja preskusa, pri čemer je treba opisati naravo anomalije. Opozoriti je treba, da so nenormalne ličinke in mladice lahko naraven pojav in jih je v kontrolah pri nekaterih vrstah lahko več odstotkov. Kadar so deformacije in z njimi povezano nenormalno vedenje tako hudi, da organizem znatno trpi in si ne bo več mogel opomoči, se lahko izloči iz preskusa. Te živali je treba evtanazirati in jih v nadaljnji analizi podatkov zajeti v odstotek smrtnosti. Normalen razvoj zarodka je evidentiran za večino vrst, priporočenih za to preskusno metodo (9) (10) (11) (12).

29. **Nenormalno vedenje**: anomalije, npr. hiperventilacijo, nekoordinirano plavanje, netipično mirovanje in netipično vedenje pri hranjenju, je treba zapisovati v rednih časovnih razmikih, ki so odvisni od trajanja preskusa (npr. enkrat na dan pri toplovodnih vrstah). Čeprav je te učinke težko kvantificirati, lahko, če so opaženi, pripomorejo k razlagi podatkov o smrtnosti.

30. **Teža**: na koncu preskusa se vse preživele ribe stehtajo vsaj na podlagi ponovljenih vzorcev (v poročilo se vključita število živali v ponovljenem vzorcu in srednja vrednost teže na žival): priporoča se, da se v poročilo vključi mokra teža (osušena s pivnikom), vendar se lahko vanj vključijo tudi podatki o suhi teži (13).

31. **Dolžina**: na koncu preskusa se izmeri dolžina posameznih osebkov. Priporočljiva je meritev skupne dolžine, če pa pride do razpada repne plavuti ali erozije plavuti, se lahko uporabi standardna dolžina. Izbrano metodo je treba uporabiti pri vseh ribah v danem preskusu. Dolžina posameznega osebka se lahko izmeri na primer s kljunastim merilom, digitalnim fotoaparatom ali kalibriranim okularnim mikrometrom. Običajne najmanjše dolžine so opredeljene v Dodatku 2.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

32. Priporočljivo je, da zasnova preskusa in izbira statističnega testa zagotavljata ustrezno moč (80 % ali več) opažanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC. Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Če se poroča o EC_x, morata zasnova preskusa in izbira regresijskega modela omogočati oceno vrednosti EC_x, tako da (i) 95-odstotni interval zaupanja za EC_x ne bo vseboval ničle in ne bo preširok, (ii) da 95-odstotni interval zaupanja za napovedano srednjo vrednost EC_x ne bo vseboval srednje vrednosti kontrole in (iii) da ne bo statistično značilne neprilagojenosti regresijskega modela podatkom. Pri obeh pristopih je treba opredeliti odstotek spremembe pri vsaki končni točki, ki je pomemben za zaznavanje ali oceno. Preskus mora biti zasnovan tako, da to omogoča. Kadar zgoraj navedeni pogoji za določitev EC_x niso izpolnjeni, je treba uporabiti pristop NOEC. Enak odstotek spremembe najverjetneje ne bo veljal za vse končne točke,

▼M7

poleg tega izvedljivega preskusa najverjetneje ne bo mogoče zasnovati tako, da bodo ta merila izpolnjena pri vseh končnih točkah, zato se je treba pri ustreznem načrtovanju preskusa osredotočiti na končne točke, ki so pomembne za preskus. Statistični diagrami in smernice za oba pristopa so na voljo v dodatkih 5 in 6; namenjeni so pomoči pri obdelavi podatkov in izbiri najustreznejšega statističnega testa ali modela. Lahko se uporabijo tudi drugi statistični pristopi, vendar le, če so znanstveno utemeljeni.

33. Variacije je treba v vsakem nizu ponovljenih vzorcev analizirati z analizo variance ali s postopki kontingenčne tabele ter na podlagi zgornje izbire izbrati ustrezne metode statistične analize. Da bi naredili večkratno primerjavo med rezultati pri posameznih koncentracijah in rezultati kontrol, se za zvezne odzive priporoča uporaba regresijskega testa po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test, za kvantizirane odzive, ki so skladni z monotonim odzivom na koncentracijo in ki ne kažejo ekstra-binomske variance (14), pa se priporoča uporaba regresijskega Cochran-Armitagevega testa. Pri ekstra-binomskih variancah se priporoča Rao-Scottova prilagoditev Cochran-Armitagevega testa (15) (16) ali pa se pri deležih ponovljenih vzorcev uporabi Williamsov test, Dunnettov test (po arkus sinus-korenski pretvorbi) ali test po Jonckheere-Terpstraju. Kadar podatki niso skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, je za zvezne odzive uporabna Dunnettova, Dunnova ali Mann-Whitneyjeva metoda, za kvantizirane odzive pa Fisherjev eksaktni test (14) (17) (18). Pri uporabi statističnih metod ali modelov je treba paziti, da so izpolnjene vse zahteve za posamezno metodo ali model (npr. da je v zasnovi preskusa ter uporabljenem preskusu ali modelu ocenjena in upoštevana variabilnost med različnimi komorami). Ovrednotiti je treba normalnost podatkov; v Dodatku 5 je navedeno, kaj je treba storiti z ostanki iz analize variance. V Dodatku 6 so navedeni dodatni napotki za obravnavo regresijskega pristopa. Upoštevati je treba pretvorbe, ki omogočajo izpolnjevanje zahtev statističnega testa. Pri pretvorbah, ki omogočajo ustreznost regresijskega modela, pa je potrebna previdnost, saj na primer 25-odstotna sprememba nepretvorjenega odziva ni enaka 25-odstotni spremembi pretvorjenega odziva. Pri vseh analizah je enota analize in preskusna enota preskusna komora in ne posamezna riba, kar morajo odražati tudi preskusi domnev in regresija (3) (14) (19) (20).

Poročilo o preskusu

34. V poročilo o preskusu se vključijo naslednji podatki:

Preskusna kemikalija:

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusna vrsta:

— znanstveno ime, sev, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

▼M7

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (npr. polstatični ali pretočni, obremenitev);

— obdobje osvetljenosti;

— zasnova preskusa (npr. število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število iker na ponovljeni vzorec, material in velikost preskusnih komor (višina, širina, prostornina), prostornina vode na preskusno komoro);

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnove (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je to uporabljeno);

— metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);

— analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;

— značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika;

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

V poročilu se navedejo posamezni rezultati (ali rezultati na podlagi ponovljenih vzorcev) ter srednja vrednost in koeficient variacije, kot je ustrezno, za naslednje končne točke:

— dokazi, da kontrole ustrezajo standardom sprejemljivega preživetja za to preskusno vrsto (Dodatek 2);

— podatki o smrtnosti za posamezne stopnje (zarodek, ličinka, mladica) in skupna smrtnost;

— število dni, potrebno, da se izležejo ličinke, število izleženih ličink na dan, konec izvalitve;

— število zdravih rib na koncu preskusa;

— podatki o dolžini (opredeliti je treba, ali je bila uporabljena standardna ali skupna dolžina) in teži preživelih živali;

— pojav, opis in število morebitnih morfoloških anomalij;

— pojav, opis in število morebitnih učinkov na vedenje;

— pristop k statistični analizi (regresijska analiza ali analiza variance) in obdelava podatkov (uporabljeni statistični test ali model);

— koncentracija brez opaznega učinka za vsak ocenjeni odziv (NOEC);

▼M7

— najnižja koncentracija z opaženim učinkom (p = 0,05) za vsak ocenjeni odziv (LOEC);

— EC_x za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 90-odstotni ali 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake.

Odstopanja od preskusne metode

Razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi odstopanj od preskusne metode na rezultat preskusa

Preglednica 1

Ribje vrste, priporočene za preskušanje

SLADKOVODNE RIBE	ESTUARSKE in MORSKE RIBE
Oncorhynchus mykiss šarenka	*Cyprinodon variegatus* ovčjeglavi zobati krapovec
Pimephales promelas črnoglavi pisanec	*Menidia* sp. gavun
Danio rerio cebrica	
Oryzias latipes japonska medaka	

VIRI

(1) OECD (2012). Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 171. OECD, Pariz.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 23. OECD, Pariz.

(3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241–88. 26 str.

(4) Brauhn, J. L. in R. A. Schoettger (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills. Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011. Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W. A. in B. R. Jones (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici *et al.* (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere 86, 593–599.

(7) Hutchinson, T. H. *et al.* (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Aquatic Toxicology, zv. 76, 69–92.

(8) Poglavje C.20 te priloge, Preskus razmnoževanja vrste *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D. J. in P. R. Parrish (1977). Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests. V: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (ur. F. L. Mayer in J. L. Hamelink). ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B. *et al.* (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203: 253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005). A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20: 1–14.

(12) Devlin, E. W. *et al.* (1996). Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas Rafinesque*. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

(13) Oris, J. T., S. C. Belanger in A. J. Bailer, (2012). Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test. Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370–376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD, Pariz.

(15) Rao, J. N. K. in A. J. Scott (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics, zv. 48, 577–585.

(16) Rao, J. N. K. in A. J. Scott (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. Statistics in Medicine 18, 1373–1385.

(17) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096–1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, zv. 20, 482–491.

(19) Rand, G. M. in S. R. Petrocelli (1985). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J. T., J. H. Sullivan in J. G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium. ASTM, Philadelphia.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

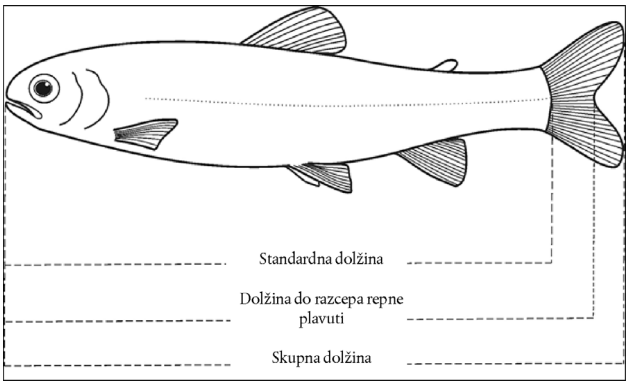
Dolžina do razcepa repne plavuti (FL): je dolžina od konice nosu do konca zajede med repnima plavutnicama in se uporablja za ribe, pri katerih je težko določiti, kje se konča hrbtenica (www.fishbase.org).

Standardna dolžina (SL): je dolžina ribe od konice nosu do posteriornega konca zadnjega hrbteničnega vretenca ali posteriornega konca osrednjega dela hipuralne plošče, kjer se konča hrbtenica. Ta meritev torej ne vključuje dolžine repne plavuti (www.fishbase.org).

Skupna dolžina (TL): je dolžina od konice nosu do skrajnega dela daljšega režnja repne plavuti in se običajno izmeri tako, da sta režnja stisnjena ob sredinski črti. To je meritev, ki se izvede v ravni črti in ne upošteva oblike telesa (www.fishbase.org).

Slika 1

Opis različnih uporabljenih dolžin



Kemikalija: snov ali zmes.

EC_x: (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti. EC_{50} je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, bi bilo treba podrobno pojasniti izbiro vrednosti LOEC (in s tem tudi NOEC). Smernice so zajete v dodatkih 5 in 6.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$) v danem obdobju izpostavljenosti.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

▼M7

Dodatek 2

PRESKUSNI POGOJI, TRAJANJE IN MERILA PREŽIVETJA ZA PRIPOROČENE VRSTE

VRSTE	PRESKUSNI POGOJI			PRIPOROČENO TRAJANJE PRESKUSA	Tipična najmanjša srednja skupna dolžina kontrolnih rib na koncu študije (mm) [1]	PREŽIVETJE V KONTROLAH (najmanjši %)	
	Temperatura (°C)	Slanost ($^0/_{00}$)	Obdobje osvetljenosti (ure)			Uspeh izvalitve	Preživetje po izvalitvi
Sladkovodne ribe:							
Oncorhynchus mykiss šarenka	10 ± 1,5 [2]		12–16 [3]	2 tedna po tem, ko se kontrolne ribe začnejo hraniti same (ali 60 dni po izvalitvi)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas črnoglavi pisanec	25 ± 1,5		16	32 dni od začetka preskusa (ali 28 dni po izvalitvi)	18	70 %	75 %
Danio rerio cebrica	26 ± 1,5		12–16 [4]	30 dni po izvalitvi	11	70 %	75 %
Oryzias latipes japonska medaka	25 ± 2		12–16 [5]	30 dni po izvalitvi	17	80 %	80 %
Estuarske in morske ribe:							
Cyprinodon variegatus ovčjeglavi zobati krapovec	25 ± 1,5	15–35 [5]	12–16 [4]	32 dni od začetka preskusa (ali 28 dni po izvalitvi)	17	75 %	80 %
Menidia sp. gavun	22–25	15–35 [5]	13	28 dni	20	80 %	60 %

Legenda:

[1] Tipična najmanjša srednja skupna dolžina sicer ni merilo za veljavnost, vendar je treba odstopanja, ki so nižja od navedenih vrednosti, skrbno proučiti glede na občutljivost preskusa. Najmanjša srednja skupna dolžina se izpelje na podlagi nabora trenutno razpoložljivih podatkov.

[2] Določeni sevi preskušenih šarenk bodo morda zahtevali uporabo drugačne temperature. Plemenske ribe je treba vzdrževati pri enaki temperaturi kot ikre. Po prejemu iker od komercialnega gojitelja je potrebno krajše prilagajanje (npr. 1–2 h) na preskusno temperaturo.

[3] Ličinke morajo biti do enega tedna po izvalitvi v temi, razen kadar se izvaja pregled, nato pa ves čas preskusa (12- do 16-urno obdobje osvetljenosti) v blagi svetlobi. [4]

[4] Režim osvetlitve mora biti stalen pri vseh preskusnih pogojih.

[5] Pri vseh preskusih se to izvede pri ± 2 $^0/_{00}$.

▼M7

Dodatek 3

NAVODILA ZA HRANJENJE PLEMENSKIH RIB IN PRESKUSNIH ŽIVALI PRIPOROČENIH VRST TER RAVNANJE Z NJIMI

VRSTE	HRANA (*)				ČAS PRENOSA PO IZVALITVI	ČAS DO PRVEGA HRANJENJA
	Plemenske ribe	Pravkar izležene ličinke	Mladice			
			Vrsta	Pogostost		
Sladkovodne ribe:						
Oncorhynchus mykiss šarenka	hrana za postrvi	brez (α)	začetna hrana za postrvi BSN	2–4 hranjenja na dan	14–16 dni po izvalitvi ali ob splavanju (ni nujno)	19 dni po izvalitvi ali splavanju
Pimephales promelas črnoglavi pisanec	BSN, hrana v kosmičih, FBS	BSN	BSN48, hrana v kosmičih	2–3 hranjenja na dan	ob 90-odstotni izvalitvi	2 dneva po izvalitvi
Danio rerio cebrica	BSN, hrana v kosmičih	komercialna hrana za ličinke, praživali (β), beljakovine (γ)	BSN48, hrana v kosmičih	BSN enkrat na dan, hrana v kosmičih dvakrat na dan	ob 90-odstotni izvalitvi	2 dneva po izvalitvi
Oryzias latipes japonska medaka	hrana v kosmičih	BSN, hrana v kosmičih (ali praživali ali kotačniki)	BSN48, hrana v kosmičih (ali kotačniki)	BSN enkrat na dan, hrana v kosmičih dvakrat na dan ali hrana v kosmičih in kotačniki enkrat na dan	ni relevantno	6–7 dni po drstitvi
Estuarske in morske ribe:						
Cyprinodon variegatus ovčjeglavi zobati krapovec	BSN, hrana v kosmičih, FBS	BSN	BSN48	2–3 hranjenja na dan	ni relevantno	1 dan po izvalitvi/splavanju
Menidia sp. gavun	BSN48, hrana v kosmičih	BSN	BSN48	2–3 hranjenja na dan	ni relevantno	1 dan po izvalitvi/splavanju

Legenda:

(*) Hrana se odmerja tako, da so živali site. Ostanke hrane in iztrebke je treba odstraniti, da se prepreči kopičenje odpadkov.
FBS zamrznjeni morski rakci (angl. *frozen brine shrimps*); odrasli rakci vrste *Artemia sp.*
BSN navpliji morskih rakcev (angl. *brine shrimp nauplii*); pravkar izlegli
BSN48 navpliji morskih rakcev (angl. *brine shrimp nauplii*); stari 48 ur
(α) ličinke z vrečico rumenjaka ne potrebujejo hrane
(β) prefiltrirane iz mešane kulture
(γ) granule, pridobljene v postopku fermentacije

▼**M7**

Dodatek 4

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Sestavina	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amonijak	1 µg/l
preostali klor	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

▼M7

Dodatek 5

STATISTIČNE SMERNICE ZA DOLOČITEV VREDNOSTI NOEC

Splošno

Enota analize je ponovitveni akvarij. Pri neprekinjenih meritvah, kot je meritev velikosti, je treba izračunati srednjo vrednost ali mediano ponovljenih vzorcev, te vrednosti ponovljenih vzorcev pa so podatki, ki se uporabijo za analizo. Dokazati je treba moč uporabljenih preskusov, po možnosti na podlagi ustrezne zbirke preteklih podatkov za vsak laboratorij. Za vsako končno točko pri statističnem testu, ki bo uporabljen, je treba navesti učinek na velikost, ki ga je mogoče opaziti s 75- do 80-odstotno močjo.

V zbirkah podatkov, ki so bile na voljo v času razvoja te preskusne metode, se določi možna moč ob uporabi priporočljivih statističnih postopkov. Posamezni laboratorij mora dokazati, da lahko izpolnjuje to zahtevo po moči, tako da sam izvede analizo moči ali dokaže, da koeficient variacije (v nadaljnjem besedilu: KV) za vsak odziv ne presega 90. centila KV, uporabljenih pri pripravi smernic za preskušanje. Ti KV so navedeni v preglednici 1. Če so na voljo le srednje vrednosti ali mediane ponovljenih vzorcev, KV znotraj ponovljenega vzorca ni treba upoštevati.

Preglednica 1

90. centil KV pri izbranih sladkovodnih vrstah

Vrsta	Odziv	KV med ponovljenimi vzorci	KV znotraj ponovljenega vzorca
šarenka	dolžina	17,4	9,8
	teža	10,1	28
črnoglavi pisanec	dolžina	16,9	13,5
	teža	11,7	38,7
cebrica	dolžina	43,7	11,7
	teža	11,9	32,8

Pri skoraj vseh statističnih testih, ki se uporabljajo za oceno laboratorijskih toksikoloških študij, so najpogostejše primerjave med tretiranimi skupinami in kontrolo. Zato ni ustrezno zahtevati F-testa statistične značilnosti z analizo variance pred uporabo Dunnettovega ali Williamsovega testa oziroma Kruskal-Wallisovega testa statistične značilnosti pred uporabo testa po Jonckheere-Terpstraju, Mann-Whitneyjevega testa ali Dunnovega testa (Hochberg in Tamhane 1987; Hsu 1996; Dunnett 1955, 1964; Williams 1971, 1972, 1975, 1977; Robertson *et al.* 1988; Jonckheere 1954; Dunn 1964).

Dunnettov test vključuje prilagoditev številčnosti, na deleža lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov pri njem pa negativno vpliva uporaba F-testa za referenco. Podobno regresijski Williamsov test in regresijski test po Jonckheere-Terpstraju, pri katerih se ves čas uporablja stopnja značilnosti 0,05, ohranjata splošni 5-odstotni delež lažnih pozitivnih rezultatov, na ta delež in moč preskusov pa negativno vpliva uporaba F-testa ali Kruskal-Wallisovega testa za referenco. Mann-Whitneyjev in Dunnov test je treba prilagoditi številčnosti, pri čemer se priporoča Bonferroni-Holmova prilagoditev.

Za podrobno razpravo o večini priporočil glede preskušanja domnev in preverjanja predpostavk, na katerih temeljijo ti testi, glej OECD (2006), ki vsebuje tudi obširno bibliografijo.

▼M7

Tretiranje kontrol, če se uporabi topilo

Če se uporabi topilo, je treba vključiti kontrolo z vodo za redčenje in kontrolo s topilom. Obe kontroli je treba primerjati pri vsakem odzivu in ju združiti za statistično analizo, če med njima niso bile ugotovljene značilne razlike. Sicer je treba za določitev vrednosti NOEC ali oceno EC_x uporabiti kontrolo s topilom, kontrola z vodo pa se ne uporabi. Glej omejitve meril za veljavnost preskusa (odstavek 7).

Pri dolžini, teži in deležu izleženih iker, umrlih ličink ali nenormalnih ličink ter prvem ali zadnjem dnevu valitve ali splavanja je treba uporabiti T-test ali Mann-Whitneyjev test za primerjavo kontrole z vodo za redčenje in kontrole s topilom z ravnjo značilnosti 0,05, pri čemer tretirane skupine niso upoštevane. Rezultate teh testov je treba vključiti v poročilo.

Meritve velikosti (dolžina in teža)

Podatki o dolžini in teži posameznih rib so lahko porazdeljeni normalno ali logaritemsko normalno. V obeh primerih so srednje vrednosti ponovljenih vzorcev običajno normalno porazdeljene s centralnim limitnim izrekom in potrjene na podlagi podatkov iz več kot 100 študij o zgodnjih razvojnih fazah treh sladkovodnih vrst. Kadar podatki ali zbirke preteklih podatkov kažejo na logaritemsko normalno porazdelitev podatkov o velikosti posameznih rib, se lahko namesto tega za vrednosti pri posameznih ribah logaritmirajo srednje vrednosti ponovljenih vzorcev, podatki za analizo pa so lahko nato antilogaritem teh logaritmov srednjih vrednosti ponovljenih vzorcev.

Oceniti je treba skladnost podatkov z normalno porazdelitvijo in homogenostjo variance. Za ta namen je treba uporabiti ostanke iz analize variance, pri čemer je koncentracija edina razlagalna razredna spremenljivka. Lahko se uporabi vizualno določanje z razsevnih grafikonov in histogramov ali histogramov s številkami. Namesto tega se lahko uporabi formalni test, na primer Shapiro-Wilkov ali Anderson-Darlingov test. Skladnost s homogenostjo variance se lahko oceni z vizualnim pregledom omenjenega razsevnega grafikona ali formalno z Levenejevim testom. Normalnost ali homogenost variance je treba oceniti samo pri parametričnih testih (npr. Williamsov ali Dunnettov test).

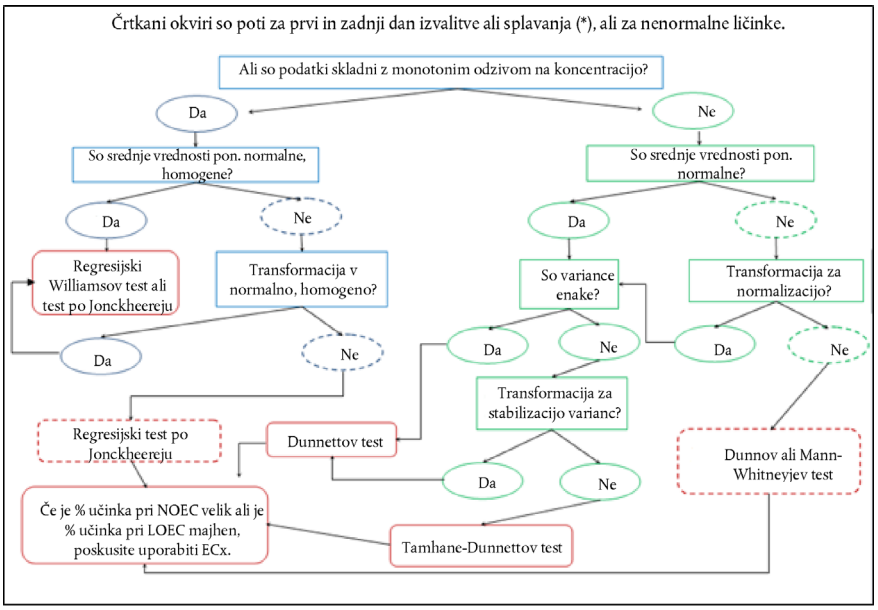
Pozornost je treba nameniti možnim osamelcem in njihovemu vplivu na analizo. Uporabita se lahko Tukeyjev test osamelcev in vizualni pregled zgoraj opisanih prikazov ostankov. Opozoriti je treba, da opazovanja vključujejo celotne ponovljene vzorce, zato se osamelci izločijo iz analize šele po temeljitem premisleku.

Statistični testi, ki upoštevajo značilnosti zasnove preskusa in biološka pričakovanja, so regresijski trendnostni testi, kot sta Williamsov test ali test po Jonckheere-Terpstraju. Ti testi predvidevajo monoton odziv na koncentracijo, zato je treba skladnost podatkov oceniti ob upoštevanju te predpostavke. Mogoča je vizualna ocena razsevnega grafikona srednjih vrednosti ponovljenih vzorcev v odvisnosti od preskusnih koncentracij. Pri tem se lahko razsevni grafikon prekrije z razdeljenim linearnim grafom, kar omogoči povezavo srednjih vrednosti koncentracij, uteženih z velikostjo ponovljenega vzorca. Veliko odstopanje razdeljenega linearnega grafa od monotonosti pomeni, da bo morda treba uporabiti netrendnostne teste. Namesto tega se lahko uporabijo formalni testi. Preprost formalni test je izračun linearnih in kvadratnih kontrastov srednjih vrednosti koncentracij. Če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ni, to pomeni, da morda obstaja težava, povezana z monotonostjo, ki jo je treba nadalje ovrednotiti na podlagi prikazov. Pri težavah z normalnostjo ali homogenostjo variance se lahko ti kontrasti oblikujejo na podlagi podatkov o pretvorbi porazdelitve. Uporabijo se lahko tudi drugi postopki, na primer Bartholomewjev test monotonosti, vendar so ti kompleksnejši.

▼M7

Slika 2

Diagram poteka za določitev vrednosti NOEC pri meritvah velikosti (dolžina in teža)



(*) Ti odzivi nikoli ne izpolnjujejo predpostavk za parametrične analize ali modele.

Razen če podatki niso skladni z zahtevami zanju, se vrednosti NOEC določijo z regresijsko uporabo Williamsovega testa ali testa po Jonckheere-Terpstraju. Za podrobnosti o teh postopkih glej OECD (2006). Za podatke, ki niso skladni z zahtevami za regresijski trendnostni test, se lahko uporabita Dunnettov test ali Tamhane-Dunnettov (T3) test, ki vključujeta prilagoditev številčnosti. Oba testa predpostavljata normalnost, Dunnettov test pa tudi homogenost variance. Kadar navedeni pogoji niso izpolnjeni, se lahko uporabi Dunnov neparametrični test. Za podrobnosti o teh testih glej OECD (2006). Slika 2 prikazuje, kako se odločiti za pravi test.

Izvalitev iker in preživetje ličink

Podatki se nanašajo na delež iker, ki se izležejo, ali ličink, ki preživijo v posameznih ponovljenih vzorcih. Pri teh deležih je treba oceniti ekstrabinomsko varianco, ki je pri takih meritvah običajna, ni pa splošna. Diagram poteka na sliki 3 je smernica za izbiro ustreznega testa; glej besedilo za podrobne opise.

Običajno se uporabljata dva testa. To sta Taronejev C(α)-test (Tarone 1979) in test hi-kvadrat, ki se posebej uporabita pri vsaki preskusni koncentraciji. Če se ekstra-binomska varianca odkrije celo pri eni sami preskusni koncentraciji, je treba uporabiti metode, ki so primerne za to.

Formula 1

Taronejev C(α)-test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

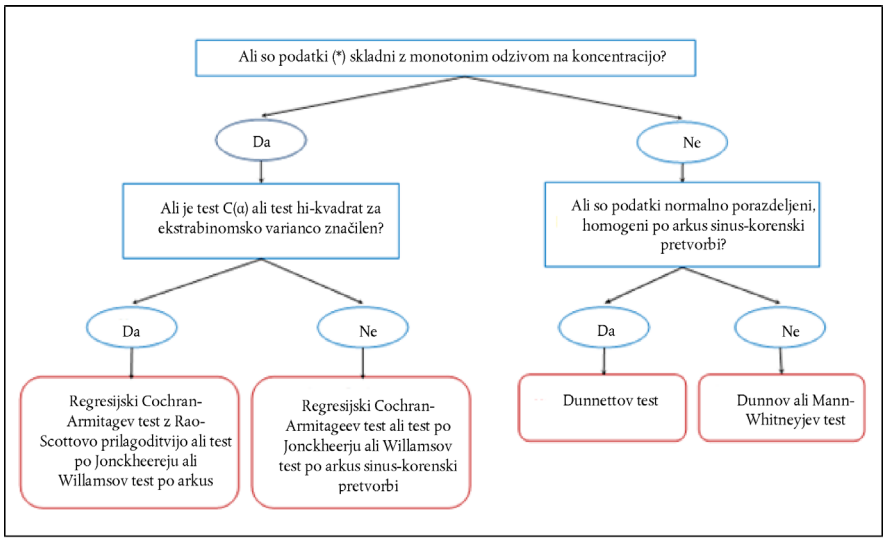
pri čemer je $\hat{p}$ srednja vrednost deleža pri določeni koncentraciji, **m** je število ponovitvenih akvarijev, $\mathbf{n_j}$ je število osebkov v ponovljenem vzorcu **j**, $\mathbf{x_j}$ pa število osebkov v navedenem ponovljenem vzorcu, ki se na primer niso izlegli

▼M7

ali so umrli. Ta test se uporabi za vsako koncentracijo posebej. Ta test nekateri vidijo kot prilagojeni test hi-kvadrat, vendar so omejene simulacije moči, ki jih je izvedel Tarone, pokazale, da ima večjo moč od testa hi-kvadrat.

Slika 3

Diagram poteka za določitev vrednosti NOEC pri izvalitvi iker in smrtnosti ličink



(*) Podatki vključujejo delež ponovljenih vzorcev .

Kadar ne obstajajo statistično značilni dokazi o ekstra-binomski varianci, se lahko uporabi regresijski Cochran-Armitagev test. Ta test ne upošteva ponovljenih vzorcev, zato se pri obstoju takih dokazov priporoča uporaba Rao-Scottove prilagoditve Cochran-Armitagevega testa (RSCA), ki upošteva ponovljene vzorce, velikost ponovljenih vzorcev in ekstra-binomsko varianco. Uporabiti je mogoče tudi regresijski Williamsov test, regresijski test po Jonckheere-Terpstraju in Dunnettov test, kakor so opisani za meritve velikosti. Ti testi se lahko uporabijo ne glede na to, ali obstaja ekstra-binomska varianca, vendar je njihova moč nekoliko manjša (Agresti 2002; Morgan 1992; Rao in Scott 1992, 1999; Fung *et al.* 1994, 1996).

Prvi ali zadnji dan valitve ali splavanja

Odziv je celo število, ki označuje preskusni dan, ko je bila opažena navedena opazka za določen ponovitveni akvarij. Območje vrednosti je običajno zelo omejeno in deleži povezanih vrednosti so običajno visoki, npr. vsi ponovljeni kontrolni vzorci imajo isti prvi dan valitve, ta pa je isti tudi pri eni ali dveh nizkih preskusnih koncentracijah. Parametrični testi, kot sta Williamsov in Dunnettov test, niso primerni za te podatke. Če ni dokazov o resni nemonotonosti, ima regresijski test po Jonckheere-Terpstraju veliko moč zaznavanja učinkov preskusne kemikalije. V nasprotnem primeru se lahko uporabi Dunnov test.

Anomalije pri ličinkah

Odziv je število ličink, pri katerih se odkrijejo kakršne koli anomalije. Ta odziv ima pogosto nizko pojavnost, pri njem se pojavljajo nekatere težave, ki so prisotne pri določanju prvega dneva valitve, včasih pa je zanj značilna tudi neenakomernost pri odzivu na koncentracijo. Če podatki vsaj približno sledijo monotoni krivulji koncentracije, je regresijski test po Jonckheere-Terpstraju dovolj močan za zaznavanje učinkov. V nasprotnem primeru se lahko uporabi Dunnov test.

▼M7

Viri

Agresti, A. (2002). Categorical Data Analysis, druga izdaja. Wiley, Hoboken.

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. American Statistical Association, št. 50, 1096–1121.

Dunn, O. J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. Technometrics, št. 6, 241–252.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, zv. 20, 482–491.

Fung, K. Y., D. Krewski, J. N. K. Rao, A. J. Scott (1994). Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data. Risk Analysis, št. 14, 639–648.

Fung, K. Y., D. Krewski, R. T. Smythe (1996). A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay. Canadian Journal of Statistics, št. 24, 431–454.

Hochberg, Y. in A. C. Tamhane (1987). Multiple Comparison Procedures. Wiley, New York.

Hsu, J. C. (1996). Multiple Comparisons: Theory and Methods. Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A. R. (1954). A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. Biometrika, št. 41, 133.

Morgan, B. J. T. (1992). Analysis of Quantal Response Data. Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, št. 54. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD), Pariz.

Rao, J. N. K. in Scott A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, zv. 48, 577–585.

Rao, J. N. K. in Scott A. J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. Statistics in Medicine, št. 18, 1373–1385.

Robertson, T., Wright F. T. in Dykstra R. L. (1988). Order restricted statistical inference. Wiley.

Tarone, R. E. (1979). Testing the goodness of fit of the Binomial distribution. Biometrika, št. 66, 585–590.

Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, zv. 27, 103–117.

Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, zv. 28, 519–531.

Williams, D. A. (1975). The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy. Biometrics zv. 31, 949–952.

Williams, D. A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means. Biometrika št. 64, 9–14.

▼M7

Dodatek 6

STATISTIČNE SMERNICE ZA REGRESIJSKE OCENE

Splošno

Opazovanja, uporabljena za prilagoditev modela, so srednje vrednosti ponovljenih vzorcev (dolžina in teža) ali deleži ponovljenih vzorcev (izležene ikre in smrtnost ličink) (OECD 2006).

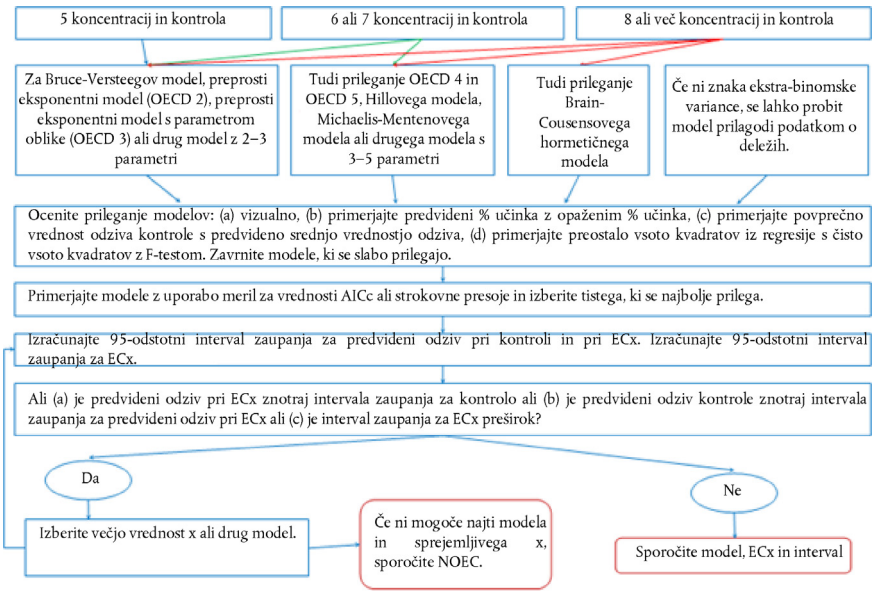
Običajno se priporoča uteženа regresija, ki za utež uporablja velikost ponovljenega vzorca. Mogoči so tudi drugi načrti uteževanja, kot je uteževanje s predvideno srednjo vrednostjo odziva ali kombinacija tega in velikosti ponovljenega vzorca. Uteževanje z obratno vrednostjo variance znotraj vzorca koncentracije ni priporočljivo (Bunke *et al.* 1999; Seber in Wild 2003; Motulsky in Christopoulos 2004; Huet *et al.* 2003).

Pri vseh pretvorbah odzivov pred analizo je treba ohraniti neodvisnost opazovanj in EC_x, njihove meje zaupanja pa je treba izraziti v izvirnih enotah meritve in ne v pretvorjenih enotah. 20-odstotna sprememba logaritma dolžine na primer ne ustreza 20-odstotni spremembi dolžine (Lyles *et al.* 2008; Draper in Smith 1999).

V diagramu poteka na sliki 4 je predstavljen pregled ocen EC_x. Podrobnosti so opisane v spodnjem besedilu.

Slika 4

Diagram poteka za oceno EC_x srednjih vrednosti ponovljenih vzorcev pri meritvah dolžine, teže, deleža izleženih iker ali umrlih ličink; za več podrobnosti glej besedilo



Obravnavanja izvalitve iker in smrtnosti ličink

Za izvalitev iker in smrtnost ličink je običajno najbolje prilagoditi padajoči model, lahko pa se prilagodi probit model, kot je opisano spodaj. To pomeni, da je treba modelirati delež iker, ki se ne izležejo, ali ličink, ki umrejo. EC_x se namreč nanaša na koncentracijo, pri kateri se zgodi sprememba, ki ustreza x % srednje vrednosti odziva v kontroli. Če se ne izleže 5 % kontrolnih iker in se modelira neuspešnost izvalitve, se EC_{20} nanaša na koncentracijo, pri kateri se zgodi sprememba, ki ustreza 20 % 5-odstotne neuspešnosti izvalitve v kontroli, to pa je sprememba v višini 0,2 * 0,05 = 0,01 ali 1 odstotne točke 6-odstotne neuspešnosti izvalitve. Tako majhna sprememba se ne more smiselno oceniti

▼M7

na podlagi razpoložljivih podatkov in ni biološko pomembna. Če pa bi se modeliral delež izleženih iker, bi bil kontrolni delež v zgornjem primeru 95 %, 20-odstotno zmanjšanje srednje vrednosti v kontroli pa bi pomenilo spremembo v višini 0,95 * 0,2 = 0,18, tj. spremembo s 95-odstotne uspešnosti izvalitve na 77-odstotno (= 95 – 18) uspešnost izvalitve, to pa je koncentracija z učinkom, ki se lahko oceni in bo za raziskovalce najverjetneje zanimivejša. To ne velja za meritve velikosti, čeprav škodljivi učinki na velikost običajno pomenijo zmanjšanje velikosti.

Modeli za velikost (dolžina ali teža), uspešnost izvalitve iker in preživetje ličink

Razen Brain-Cousensovega hormetičnega modela so vsi modeli opisani in priporočeni v OECD (2006). Tako imenovani modeli OECD 2–5 so poleg tega obravnavani v okviru preskusov ekotoksičnosti v Slob (2002). Seveda obstajajo tudi številni drugi modeli, ki bi lahko bili uporabni. Bunke *et al.* (1999) navajajo številne modele, ki niso navedeni tukaj, poleg tega obstaja mnogo sklicevanj na druge modele. Spodaj navedeni modeli so predlagani kot posebej ustrezni za ekotoksikološke preskuse in se pogosto uporabljajo.

Pri 5 preskusnih koncentracijah in kontroli:

— Bruce-Versteegov model,

— preprosti eksponentni model (OECD 2),

— eksponentni model s parametrom oblike (OECD 3),

— preprosti eksponentni model s spodnjo mejo (OECD 4).

Pri 6 ali več preskusnih koncentracijah in kontroli:

— eksponentni model s parametrom oblike in spodnjo mejo (OECD 5),

— Michaelis-Mentenov model,

— Hillov model.

Kadar je vidna hormeza (najverjetneje ne pri uspešnosti izvalitve iker ali preživetju ličink, včasih pa pri opazovanjih velikosti):

— Brain-Cousensov hormetični model (Brain in Cousens 1989).

Drugi modeli za neuspešnost izvalitve iker in smrtnost ličink

— Modeli za naraščajoče vrednosti teh odzivov se lahko ob odsotnosti ekstra-binomske variance prilagodijo s probit (ali logističnimi) modeli, nato se v prilagoditvi modela oceni kontrolna pojavnost. To ni najbolj priporočljiva metoda, saj kot enoto analize upošteva posamezni osebek in ne ponovljeni vzorec (Morgan 1992; O'Hara Hines in Lawless 1993; Collett 2002, 2003).

Prileganje posameznih modelov

— Vizualno je treba primerjati opaženo in predvideno odstotno zmanjšanje pri vsaki preskusni koncentraciji (Motulsky in Christopoulos 2004; Draper in Smith 1999).

— Z F-testom se srednja kvadratna napaka regresije primerja s čisto srednjo kvadratno napako (Draper in Smith 1999).

— Preveriti je treba, ali se vse postavke v modelu statistično značilno razlikujejo od ničle (tj. določite, ali so postavke modela statistično značilne) (Motulsky in Christopoulos 2004).

▼M7

— Pregled ostankov iz regresije se primerja s preskusnimi koncentracijami, po možnosti na logaritemski skali za koncentracije. Ta pregled ne sme vsebovati vzorcev; točke morajo biti naključno razporejene okoli vodoravne črte pri ničelni višini.

— Oceniti je treba skladnost podatkov z normalno porazdelitvijo in homogenostjo variance, kot je navedeno v Dodatku 5.

— Poleg tega je treba oceniti normalnost ostankov iz regresijskega modela, pri čemer se uporabijo metode, ki so v Dodatku 5 navedene za ostanke iz analize variance.

Primerjava modelov

— Uporabiti je treba Akaikejev informacijski kriterij AICc. Manjše vrednosti AICc pomenijo boljše prileganje, in če je $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, je model A skoraj zagotovo boljši od modela B (Motulsky in Christopoulos 2004).

— Vizualna primerjava obeh modelov bo razkrila, kako dobro izpolnjujeta zgornja merila za posamezne modele.

— Priporoča se upoštevanje načela varčnosti, po katerem se uporabi najpreprostejši model, ki se razmeroma dobro prilega podatkom (Ratkowsky 1993; Lyles *et al.* 2008).

Kakovost ocene EC_x

Interval zaupanja za EC_x ne sme biti preširok. Za določitev največje širine intervala zaupanja, ki bo še zagotavljala uporabnost EC_x, je potrebna statistična presoja. Simulacije regresijskih modelov, prilagojenih valitvi iker in podatkom o velikosti, kažejo, da približno 75 % intervalov zaupanja za EC_x (x = 10, 20 ali 30) zajema največ dve preskusni koncentraciji. To je splošna smernica o tem, kaj je sprejemljivo, in praktična smernica o tem, kaj je mogoče doseči. Številni avtorji trdijo, da bi bilo treba intervale zaupanja za vse parametre modelov vključiti v poročilo in da široki intervali zaupanja za parametre modelov kažejo nesprejemljivost modelov (Ott in Longnecker 2008; Alvord in Rossio 1993; Motulsky in Christopoulos 2004; Lyles *et al.* 2008; Seber in Wild 2003; Bunke *et al*. 1999; Environment Canada 2005).

Interval zaupanja za EC_x (ali kateri koli drug parameter modela) ne sme vključevati ničle (Motulsky in Christopoulos 2004). V regresijskih modelih je to ekvivalent najmanjše značilne razlike, ki se pogosto navaja pri pristopih s preskušanjem predpostavk (npr. Wang *et al.* 2000). Ustreza tudi intervalu zaupanja za srednje vrednosti odzivov pri LOEC, ki niso zajete v srednjo vrednost v kontroli. Treba se je vprašati, ali je parametre mogoče znanstveno oceniti. Če je interval zaupanja za y0 na primer ± 20 %, ocena EC_{10} ni verodostojna. Če model predvideva 20-odstotni učinek pri koncentraciji C, največji opaženi učinek pri koncentraciji C in nižjih koncentraciji pa je 10-odstoten, ocena EC_{20} ni verodostojna (Motulsky in Christopoulos 2004; Wang *et al.* 2000; Environment Canada 2005).

EC_x ne bi smela zahtevati ekstrapolacije zunaj območja pozitivnih koncentracij (Draper in Smith 1999; OECD 2006). Splošna smernica bi lahko bila, da EC_x ne sme biti za več kot približno 25 % nižja od najnižje ali višja od najvišje preskušene koncentracije.

Viri

Alvord, W. G., Rossio, J. L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay. Journal of Immunological Methods št. 157, 155–163.

Brain, P. in Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. zv. 29: 93–96.

▼**M7**

Bunke, O., Droge, B. in Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics*, št. 33, 197–240.

Collett, D. (2002). Modelling Binary Data, druga izdaja. Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003). Modelling Survival Data in Medical Research, druga izdaja. Chapman and Hall, London.

Draper, N. R., in Smith, H. (1999). Applied Regression Analysis, tretja izdaja. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46.

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003). Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples. Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown in C. R. Cooper (2008). Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data. *Contemp Clin Trials*, november 2008, št. 29(6): 878–886.

Morgan, B. J. T. (1992). Analysis of Quantal Response Data. Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004). Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting. Oxford University Press, ZDA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993). Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time. *Biometrics*, zv. 49, str. 107–121.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, št. 54. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, OECD, Pariz.

Ott, R. L., M. T. Longnecker (2008). An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, šesta izdaja. Brooks-Cole, Belmont, California.

Ratkowsky, D. A. (1993). Principles of nonlinear regression. Journal of Industrial Microbiology, št. 12, 195–199.

Seber, G. A. F., C. J. Wild (2003). Nonlinear Regression. Wiley.

Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., št. 66, 298–312.

Wang, Q., D. L. Denton in R. Shukla (2000). Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program. Environmental Toxicology and Chemistry, zv. 19, str. 113–117, 2000.

▼M7

C.48 **Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 229 (2012). Preskus z ribami, s katerim je mogoče zaznati nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij zaradi interakcije teh kemikalij z endokrinim sistemom povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje možnih povzročiteljev endokrinih motenj. Del naloge je bila priprava smernic za presejalno preskušanje kemikalij, ki so aktivne v endokrinem sistemu ribjih vrst. Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib je prestal obsežen validacijski program, ki je vključeval medlaboratorijske študije z izbranimi kemikalijami, s katerimi sta bili dokazani ustreznost in zanesljivost preskusa za zaznavanje kemikalij, ki vplivajo na razmnoževanje rib z različnimi mehanizmi, vključno z endokrinimi načini (1) (2) (3) (4) (5). Vse končne točke iz smernic za preskušanje OECD so bile potrjene pri črnoglavem pisancu, podniz končnih točk pa je bil potrjen pri japonski medaki (tj. vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti) in cebrici (tj. vitelogenin). Delo v zvezi s potrditvijo je delno medsebojno strokovno pregledala skupina strokovnjakov, ki so jih imenovali nacionalni koordinatorji programa smernic za preskušanje OECD (6), delno pa neodvisna skupina strokovnjakov, ki jih je najela Agencija ZDA za varstvo okolja (29). Preskus ni namenjen opredelitvi posebnih mehanizmov hormonskih motenj, ker imajo preskusne živali nepoškodovano os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze (v nadaljnjem besedilu: os HPG), ki se lahko odziva na kemikalije, ki vplivajo na os HPG na različnih ravneh.

2. V tej preskusni metodi je opisan presejalni preskus *in vivo*, v katerem se spolno zreli ribji samci in drsteče se ribje samice zadržujejo skupaj ter so izpostavljeni kemikaliji v omejenem delu svojega življenjskega cikla (21 dni). Ob koncu 21-dnevnega obdobja izpostavljenosti se pri samcih in samicah izmerita dve biološko označevalni končni točki kot indikatorja endokrinega delovanja preskusne kemikalije; ti končni točki sta vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti. Vitelogenin se meri pri črnoglavem pisancu, japonski medaki in cebrici, sekundarne spolne značilnosti pa pri črnoglavem pisancu in japonski medaki. Poleg tega se vsak dan med celotnim preskusom spremlja kvantitativna plodnost. Spolne žleze se shranijo in lahko se oceni histopatologija, da se ugotovi, ali so preskusne živali sposobne za razmnoževanje, in se okrepi zanesljivost dokazov za druge končne točke.

3. Ta biološki preskus je presejalna študija razmnoževanja *in vivo*, njegovo uporabo pa je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira OECD za preskušanje in oceno kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (ang. *OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (30). V tem temeljnem okviru je kratkotrajni preskus razmnoževanja rib predlagan na ravni 3 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

4. Vitelogenin (v nadaljnjem besedilu: VTG) običajno proizvajajo jetra samic oviparnih vretenčarjev kot odziv na endogeni estrogen v krvnem obtoku. Je predhodna sestavina beljakovin jajčnega rumenjaka, ki po nastanku v jetrih potuje po krvožilju do jajčnika, kjer jo absorbirajo in spremenijo razvijajoča se jajčeca. Vitelogenina v plazmi nezrelih ribjih samic in samcev skoraj ni mogoče zaznati, ker nimajo dovolj estrogena v obtoku; jetra pa so sposobna sinteze in izločanja vitelogenina kot odziv na spodbujanje z eksogenim estrogenom.

▼M7

5. Meritev vitelogenina je namenjena zaznavanju kemikalij z različnimi estrogenimi načini delovanja. Estrogene kemikalije je mogoče zaznati z merjenjem indukcije vitelogenina pri ribjih samcih in je bilo obsežno dokumentirano v medsebojno strokovno pregledani znanstveni literaturi (npr. (7)). Indukcija vitelogenina je bila dokazana tudi po izpostavljenosti androgenom, ki se lahko aromatizirajo (8) (9). Zaradi zmanjšanja ravni estrogena v krvnem obtoku pri samicah, na primer z zaviranjem aromataze, ki spremeni endogeni androgen v naravni estrogen 17β-estradiol, se zmanjša raven VTG, ki se uporablja za zaznavanje kemikalij, ki imajo lastnosti zaviranja aromataze (10) (11). Biološka pomembnost odziva vitelogenina na zaviranje estrogena/aromataze je bila dokazana in obsežno dokumentirana. Vendar je mogoče, da lahko na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna toksičnost in neendokrini toksični načini delovanja, npr. hepatotoksičnost.

6. Več merilnih metod je bilo uspešno pripravljenih in standardiziranih za redno uporabo. Med njimi so metode encimskega imunskega testa (ELISA), ki so specifične za posamezne vrste in uporabljajo imunokemijo za kvantifikacijo VTG, nastalega v majhnih vzorcih krvi ali jeter, ki so bili odvzeti pri posameznih ribah (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Za meritev VTG se vzorčijo kri črnoglavega pisanca, kri ali homogenat glave/repa cebrice in jetra medake. Pri medaki je korelacija med VTG, izmerjenim v krvi, in VTG, izmerjenim v jetrih, dobra (19). V Dodatku 6 so navedeni priporočeni postopki za odvzem vzorcev za analizo VTG. Kompleti za merjenje VTG so splošno dostopni; taki kompleti morajo temeljiti na validirani metodi ELISA, specifični za posamezno vrsto.

7. Sekundarne spolne značilnosti ribjih samcev nekaterih vrst so vidne že navzven, mogoče jih je kvantificirati in se odzivajo na ravni endogenih androgenov v krvnem obtoku; to velja za črnoglavega pisanca in medako, vendar ne za cebrico, ki nima sekundarnih spolnih značilnosti, ki bi jih bilo mogoče kvantificirati. Samice so sposobne razviti moške sekundarne spolne značilnosti, če so izpostavljene androgenim kemikalijam v vodi. V znanstveni literaturi je na voljo več študij, ki dokumentirajo te vrste odziva pri črnoglavem pisancu (20) in medaki (21). Zmanjšanje sekundarnih spolnih značilnosti pri samcih je treba zaradi majhne statistične moči razlagati previdno, pri čemer mora razlaga temeljiti na strokovni presoji in zanesljivosti dokazov. Ker cebrica nima sekundarnih spolnih značilnosti, ki bi jih bilo mogoče kvantificirati in bi se odzivale na kemikalije z androgenim delovanjem, je njena uporaba v tem preskusu omejena.

8. Pri črnoglavem pisancu je glavni indikator eksogene izpostavljenosti androgenom število drstnih izpuščajev na nosu ribje samice. Pri medaki je glavni označevalec eksogene izpostavljenosti androgenim kemikalijam pri ribjih samicah število bradavičastih podaljškov. V Dodatku 5A in Dodatku 5B so navedeni priporočeni postopki za oceno spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu oziroma medaki.

9. 21-dnevni preskus z ribami vključuje oceno kvantitativnega proizvajanja iker in shranitev spolnih žlez za neobvezno histopatološko preiskavo. Nekateri regulativni organi lahko zahtevajo to dodatno končno točko za celovitejšo oceno sposobnosti preskusnih živali za razmnoževanje ali kadar izpostavljenost kemikaliji ni vplivala na vitelogenin in sekundarne spolne značilnosti. Čeprav so nekatere končne točke zelo diagnostične (npr. indukcija VTG pri samcih in tvorjenje izpuščajev pri samicah), vse končne točke (npr. plodnost in histopatologija spolnih žlez) v preskusu niso namenjene nedvoumni določitvi specifičnih celičnih mehanizmov delovanja. Šele ko so končne točke obravnavane skupaj, omogočajo sklepanje o možnih endokrinih motnjah in zagotovijo smernice za nadaljnje preskušanje. Čeprav plodnost ni izrecno povezana z endokrinim delovanjem, je zaradi dokazane občutljivosti na poznane kemikalije z endokrinim delovanjem (5) pomembna končna točka,

▼M7

ki jo je treba vključiti, saj je ob odsotnosti vpliva na to in druge končne točke mogoče z večjo gotovostjo trditi, da spojina najverjetneje ne deluje endokrino. Kadar pa vpliv na plodnost obstaja, to močno okrepi zanesljivost dokazov in sklepanje. Smernice glede razlage podatkov in sprejemljivosti rezultatov preskusa so navedene pozneje v okviru te preskusne metode.

10. Pojmi, uporabljeni pri tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

11. V preskusu so ribji samci in samice v razmnoževalnem stanju skupaj izpostavljeni v preskusnih posodah. Njihova odraslost in razmnoževalno stanje omogočata jasno razlikovanje po spolu in zato s spolom povezano analizo posamezne končne točke ter zagotavljata njihovo občutljivost na eksogene kemikalije. Na koncu preskusa se spol potrdi z makroskopskim pregledom spolnih žlez po ventralnem odprtju trebuha s škarjami. Pregled ustreznih pogojev biološkega preskusa je naveden v Dodatku 2. Preskus se običajno začne z ribo, ki je bila vzorčena iz populacije, ki je zmožna drstenja; starajoče se živali se ne smejo uporabiti. Smernice glede starosti rib in razmnoževalnega stanja so navedene v razdelku Izbira rib. Preskus se izvede s tremi koncentracijami kemikalije za izpostavljanje, kontrolo z vodo in po potrebi kontrolo s topilom. Pri cebricah se uporabita dve posodi ali ponovljena vzorca na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 5 samcev in 5 samic). Pri črnoglavem pisancu se uporabijo štiri posode ali ponovljeni vzorci na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 2 samca in 4 samice). To je namenjeno prilagoditvi teritorialnega vedenja samcev črnoglavega pisanca ob hkratni ohranitvi ustrezne moči preskusa. Pri medaki se uporabijo štiri posode ali ponovljeni vzorci na tretiranje (vsaka posoda vsebuje 3 samce in 3 samice). Izpostavljenost traja 21 dni, vzorčenje rib pa se izvede 21. dan izpostavljenosti. Kvantitativna plodnost se spremlja na dnevni ravni.

12. Pri vzorčenju na 21. dan se vse živali humano usmrtijo. Sekundarne spolne značilnosti se merijo pri črnoglavem pisancu in medaki (glej Dodatek 5A in Dodatek 5B); vzorci krvi se za določanje VTG odvzamejo pri cebrici in črnoglavem pisancu, pri čemer se lahko pri cebricah namesto tega za določanje VTG odvzame glava/rep (Dodatek 6), za analizo VTG pri medaki pa se odvzamejo jetra (Dodatek 6); spolne žleze se fiksirajo cele ali secirane za morebitno histopatološko oceno (22).

MERILA ZA SPREJEMLJIVOST PRESKUSA

13. Za sprejemljivost rezultatov preskusa morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

— smrtnost v kontrolah z vodo (ali topilom) ob koncu obdobja izpostavljenosti ne sme presegati 10 %,

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti v obdobju izpostavljenosti ves čas vsaj 60 % nasičenosti z zrakom (ASV),

— razlika v temperaturi vode v različnih preskusnih posodah v obdobju izpostavljenosti nikoli ne sme biti večja od ± 1,5 °C in jo je treba vzdrževati v območju 2 °C znotraj temperaturnih območij, določenih za preskusno vrsto (Dodatek 2),

— na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih vrednosti meritev,

▼M7

— na voljo morajo biti dokazi, da se ribe aktivno drstijo v vseh ponovljenih vzorcih pred začetkom izpostavljenosti kemikaliji in v ponovljenih kontrolnih vzorcih ves čas trajanja preskusa.

OPIS METODE

Oprema

14. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

a. oksimetri in merilniki pH,

b. oprema za določanje trdote in alkalnosti vode,

c. ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje,

d. akvariji iz kemijsko inertnih materialov in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej Dodatek 2),

e. substrat za drstenje pri črnoglavem pisancu in cebrici, za podrobnosti glej Dodatek 4,

f. ustrezno natančna tehtnica (tj. natančna na 0,5 mg).

Voda

15. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri kaže preskusna vrsta primerno dolgotrajno preživetje in rast. Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju ± 0,5 pH enote. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije), je treba redno odvzemati vzorce za analizo. Izvajati je treba meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd in Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} in SO_4^{2-}), pesticidov (npr. skupnih organofosfornih in skupnih organoklornih pesticidov), skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi, na primer vsake tri mesece, kadar se ve, da je voda za redčenje relativno konstantne kakovosti. Če se dokaže, da je bila kakovost vode konstantna vsaj eno leto, se lahko meritve izvajajo manj pogosto, časovni razmiki pa se lahko podaljšajo (npr. na vsakih šest mesecev). Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 3.

Preskusne raztopine

16. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo kolone za nasičevanje raztopine. Uporaba topila kot nosilca ni priporočljiva. Če je topilo potrebno, je treba vzporedno izvajati kontrolo s topilom z enako koncentracijo topila kot pri tretiranjih s kemikalijami. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, je lahko topilo tehnično najboljša rešitev; upoštevati je treba dokument s smernicami OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (23). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti snovi ali zmesi. V dokumentu s smernicami OECD se priporoča največ 100 µl/l, kar je treba upoštevati. Vendar so bili v zadnjem pregledu (24) izraženi dodatni pomisleki glede uporabe topil za preskušanje endokrinega delovanja. Zato se priporoča, da se koncentracije topila, če je to sploh potrebno, kar najbolj zmanjšajo, kadar koli je to tehnično izvedljivo (glede na fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije).

▼M7

17. Uporabi se pretočni preskusni sistem. Ta sistem stalno odmerja in redči osnovno raztopino preskusne kemikalije (npr. merilna črpalka, proporcionalni razredčevalnik in sistem naprav za nasičenje), da dovaja niz koncentracij v preskusne komore. Pretok osnovnih raztopin in vode za redčenje je treba med preskusom preverjati v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsak dan, in se ne sme razlikovati za več kot 10 % med celotnim preskusom. Izogibati se je treba uporabi nizkokakovostnega plastičnega cevnega materiala ali drugih materialov, ki lahko vsebujejo biološko aktivne kemikalije. Pri izbiri materiala za pretočni sistem je treba upoštevati morebitno adsorpcijo preskusne kemikalije v ta material.

Vzdrževanje rib

18. Preskusne ribe je treba izbrati iz laboratorijske populacije, po možnosti iz enega staleža, ki se je vsaj dva tedna pred preskusom aklimatizirala v podobnih pogojih kakovosti vode in osvetljenosti, kot so tisti, ki se uporabijo v preskusu. Pomembno je, da sta stopnja obremenitve in gostota rib (za opredelitvi glej Dodatek 1) primerni za uporabljene preskusne vrste (glej Dodatek 2).

19. Po 48 urah prilagajanja se zabeleži smrtnost in uporabijo se naslednja merila:

— smrtnost v sedmih dneh je večja od 10 % populacije: celotna serija se zavrne;

— smrtnost med 5 % in 10 % populacije: aklimatizacija dodatnih sedem dni; če je v teh dodatnih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se celotna serija zavrne;

— smrtnost v sedmih dneh je manjša od 5 % populacije: serija se sprejme.

20. Bolezni rib se v obdobju aklimatizacije, obdobju pred izpostavljenostjo ali v obdobju izpostavljenosti ne smejo zdraviti.

Obdobje pred izpostavljenostjo in izbira rib

21. Priporoča se eno- do dvotedensko obdobje pred izpostavljenostjo, pri čemer so živali v posodah, podobnim posodam v dejanskem preskusu. Ribe je treba v celotnem obdobju vzdrževanja in med fazo izpostavljenosti hraniti *ad libitum*. Faza izpostavljenosti se začne s spolno dimorfnimi odraslimi ribami iz laboratorijske zaloge razmnoževalno zrelih živali (npr. z jasno vidnimi sekundarnimi spolnimi značilnostmi pri črnoglavem pisancu in medaki) in aktivnim drstenjem. V splošnem (vendar se to ne sme upoštevati brez opazovanja dejanskega razmnoževalnega stanja zadevne serije rib) morajo biti črnoglavi pisanci stari približno 20 (± 2) tednov, če so bili v celotni življenjski dobi gojeni pri 25 ± 2 °C. Japonske medake morajo biti stare približno 16 (± 2) tednov, če so bile v celotni življenjski dobi gojene pri 25 ± 2 °C. Cebrice morajo biti stare približno 16 (± 2) tednov, če so bile v celotni življenjski dobi gojene pri 26 ± 2 °C. V fazi pred izpostavljenostjo je treba vsak dan oceniti proizvajanje iker. Priporoča se, da se pred vključitvijo v fazo izpostavljenosti v preskusu v vseh ponovitvenih akvarijih opazuje drstenje. V tej fazi ni mogoče zagotovi kvantitativnih smernic glede želenega dnevnega proizvajanja iker, vendar je precej običajno povprečno drstenje > 10 iker dnevno na samico pri vsaki vrsti. Za porazdelitev ponovljenih vzorcev na različne stopnje preskusa je treba uporabiti zasnovo naključne porazdelitve v bloke glede na proizvajanje iker, s čimer se bo zagotovila uravnotežena porazdelitev ponovljenih vzorcev.

▼M7

ZASNOVA PRESKUSA

22. Uporabijo se tri koncentracije preskusne kemikalije, ena kontrola (z vodo) in po potrebi ena kontrola s topilom. Podatki se lahko analizirajo, da se določijo statistično značilne razlike med odzivi na tretiranje in odzivi v kontrolah. Te analize bodo pokazale, ali je za kemikalijo potrebno nadaljnje dolgotrajno preskušanje glede škodljivih učinkov (in sicer na preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje) namesto uporabe za oceno tveganja (25).

23. Pri cebrici se na 21. dan preskusa samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (5 samcev in 5 samic v vsakem od dveh ponovljenih vzorcev) ter kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina. Pri medaki se na 21. dan preskusa samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (3 samci in 3 samice v vsakem od štirih ponovljenih vzorcev) ter kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina in sekundarnih spolnih značilnosti. Pri črnoglavem pisancu se na 21. dan izpostavljenosti samci in samice iz posameznih stopenj tretiranja (2 samca in 4 samice v vsakem od štirih ponovljenih vzorcev) in kontrol vzorčijo za meritev vitelogenina in sekundarnih spolnih značilnosti. Potrebna je kvantitativna ocena plodnosti, tkivo spolnih žlez pa je po potrebi treba fiksirati cele ali secirane za morebitno histopatološko oceno.

Izbira preskusnih koncentracij

24. Za namen tega preskusa je treba najvišjo preskusno koncentracijo določiti z najvišjo tolerančno koncentracijo (v nadaljnjem besedilu: MTC), ki se določi s študijo za določanje območja delovanja ali na podlagi drugih podatkov o toksičnosti, ali 10 mg/l ali največjo topnostjo v vodi, pri čemer se uporabi najnižja od teh vrednosti. MTC je opredeljena kot najvišja preskusna koncentracija kemikalije, ki povzroči manj kot 10-odstotno smrtnost. Pri uporabi tega pristopa se domneva, da obstajajo empirični podatki o akutni toksičnosti ali drugi podatki o toksičnosti, na podlagi katerih se lahko oceni MTC. Ocena MTC je lahko netočna in običajno zahteva strokovno presojo.

25. Potrebne so tri preskusne koncentracije, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ne presega 10, in kontrola z vodo za redčenje (ter po potrebi kontrola s topilom). Priporoča se območje faktorjev razmika med 3,2 in 10.

POSTOPEK

Izbira in tehtanje preskusnih rib

26. Pomembno je, da se že na začetku preskusa čim bolj zmanjša variacija teže rib. Primerna območja velikosti za različne vrste, priporočene za uporabo v tem preskusu, so navedena v Dodatku 2. Za celotno serijo rib, uporabljenih v preskusu, je treba teže posameznih ribjih samcev in samic na začetku preskusa po možnosti vzdrževati v območju ± 20 % aritmetične sredine teže istega spola. Priporočljivo je, da se pred preskusom stehta podvzorec staleža rib, da se oceni srednja vrednost teže.

Pogoji izpostavljenosti

Trajanje

27. Preskus traja 21 dni po obdobju pred izpostavljenostjo. Priporočeno obdobje pred izpostavljenostjo traja en teden do dva tedna.

Hranjenje

28. Ribe je treba hraniti *ad libitum* s primerno hrano (Dodatek 2) dovolj pogosto, da se vzdržuje telesna kondicija. Paziti je treba, da ne pride do rasti mikrobov in motnosti vode. Kot splošna smernica se lahko dnevni obrok

▼M7

razdeli na dva ali tri enake dele za večkratno krmljenje, pri čemer morajo med posameznimi krmljenji preteči vsaj tri ure. En večji obrok je sprejemljiv zlasti ob koncih tedna. Hranjenje rib je treba prekiniti 12 ur pred vzorčenjem/nekropsijo.

29. Pri ribji hrani je treba oceniti prisotnost onesnaževal, kot so organoklorni pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in poliklorirani bifenili (PCB). Izogibati se je treba hrani z višjo ravnjo fitoestrogenov, ki bi lahko ogrozili odziv preskusa na znani agonist estrogena (npr. 17b-estradiol).

30. Nezaužito hrano in iztrebke je treba odstraniti iz preskusnih posod vsaj dvakrat na teden, npr. s previdnim čiščenjem dna posameznega akvarija z uporabo sifona.

Svetloba in temperatura

31. Obdobje osvetljenosti in temperatura vode morata biti ustrezna za preskusno vrsto (glej Dodatek 2).

Pogostost analitskega določanja in meritev

32. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije. Vzpostaviti je treba vse potrebne analitske metode, vključno z zadostnim znanjem o stabilnosti kemikalije v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določijo v rednih časovnih razmikih, kot sledi: pretoke redčila in osnovne raztopine toksične snovi je treba po možnosti preveriti vsak dan, vendar vsaj dvakrat na teden, pri čemer se med celotnim preskusom ne smejo razlikovati za več kot 10 %. Priporoča se, da se dejanske koncentracije preskusne kemikalije izmerijo v vseh posodah na začetku preskusa in nato v tedenskih časovnih razmikih.

33. Priporoča se, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih.

34. Vzorce bo morda treba filtrirati (npr. z uporabo filtra z velikostjo por 0,45 μm) ali centrifugirati. Če je filtracija potrebna, je priporočeni postopek centrifugiranje. Če pa se preskusni material ne adsorbira na filtrih, je lahko sprejemljivo tudi filtriranje.

35. Med preskusom je treba vsaj enkrat na teden v vseh preskusnih posodah izmeriti raztopljeni kisik, temperaturo in vrednost pH. Skupno trdoto in alkalnost je treba vsaj enkrat na teden izmeriti v kontrolah in eni posodi pri najvišji koncentraciji. Temperatura se po možnosti stalno spremlja v vsaj eni preskusni posodi.

Opazovanja

36. Med potekom preskusa ali ob prekinitvi preskusa se ocenijo številni splošni (npr. preživetje) in biološki odzivi (npr. ravni VTG). Vsak dan je treba kvantitativno spremljati plodnost. Merjenje in ocena teh končnih točk ter njihova uporabnost so opisani v nadaljevanju.

Preživetje

37. Ribe je treba v obdobju preskusa pregledati vsak dan, zabeležiti vsako umrlo ribo, mrtve ribe pa čim prej odstraniti. Mrtve ribe se ne smejo nadomestiti niti v kontrolnih posodah niti v tretiranih posodah. Spol rib, ki poginejo med preskusom, je treba določiti z makroskopsko oceno spolnih žlez.

▼M7

Vedenje in videz

38. Zapisati je treba vsako nenormalno vedenje (glede na kontrole); to lahko vključuje znake splošne toksičnosti, vključno s hiperventilacijo, nekoordiniranim plavanjem, izgubo ravnotežja in netipičnim mirovanjem ali hranjenjem. Zapisati je treba tudi zunanje anomalije (kot sta hemoragija in razbarvanje). Take znake toksičnosti je treba pri razlagi podatkov previdno obravnavati, ker lahko nakazujejo koncentracije, pri katerih biomarkerji endokrinega delovanja niso zanesljivi. Taka opažanja v zvezi z vedenjem lahko zagotovijo tudi koristne kvalitativne informacije, ki kažejo možne zahteve za prihodnje preskušanje rib. Pri črnoglavem pisancu, ki je bil izpostavljen androgenom, je bila na primer opažena teritorialna agresivnost normalnih samcev ali maskuliniziranih samic; pri cebrici se značilno vedenje pri parjenju in drstenju po svitanju zmanjša ali ga ovira izpostavljenost estrogenom ali antiandrogenom.

39. Ker se lahko nekateri vidiki videza (zlasti barva) pri rokovanju hitro spremenijo, je pomembno, da se kvalitativno opazovanje izvede pred odstranitvijo živali iz preskusnega sistema. Dosedanje izkušnje s črnoglavim pisancem kažejo, da lahko nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem na začetku povzročijo spremembe naslednjih zunanjih značilnosti: barve telesa (svetla ali temna), vzorcev obarvanja (prisotnost navpičnih prog) in oblike telesa (glava in območje prsi). Zato je treba opazovanje fizičnega videza rib izvesti med potekom preskusa in ob koncu študije.

Plodnost

40. Dnevna kvantitativna opazovanja drstenja je treba zapisati za vsak ponovljeni vzorec. Proizvajanje iker je treba zapisati kot število iker dnevno na preživelo samico za vsak ponovljeni vzorec. Ikre se vsak dan odstranijo iz preskusnih komor. Pri črnoglavem pisancu in cebrici se v preskusno komoro namestijo substrati za drstenje, ki ribam omogočajo normalne pogoje drstenja. V Dodatku 4 je na voljo več podrobnosti o priporočenih substratih za drstenje za cebrico (Dodatek 4A) in črnoglavega pisanca (Dodatek 4B). Substrat za drstenje pri medaki ni potreben, zato ga ni treba namestiti.

Humana usmrtitev rib

41. Ribe je treba 21. dan, tj. ob prekinitvi izpostavljenosti, evtanazirati s primernimi količinami trikaina (trikain metan sulfonat, metakain, MS-222 (št. CAS 886-86-2), 100–500 mg/l, pufran s 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrijev bikarbonat, št. CAS 144-55-8)), da se zmanjša draženje sluznice; kri ali tkivo se nato vzorči za določitev VTG, kot je pojasnjeno v razdelku o vitelogeninu.

Opazovanje sekundarnih spolnih značilnosti

42. Nekatere kemikalije z endokrinim delovanjem lahko povzročijo spremembe pri določenih sekundarnih spolnih značilnostih (število drsnih izpuščajev pri samcih črnoglavega pisanca, bradavičasti podaljški pri samcih medake). Kemikalije z nekaterimi načini delovanja lahko povzročijo nenormalno pojavnost sekundarnih spolnih značilnosti pri živalih nasprotnega spola; agonisti receptorjev za androgene, kot so trenbolon, metiltestosteron in dihidrotestosteron, lahko na primer pri samici črnoglavega pisanca povzročijo razvoj izrazitih drstnih izpuščajev, pri samici medake pa razvoj bradavičastih podaljškov (11) (20) (21). Obstajajo tudi poročila, da lahko agonisti receptorjev za estrogene zmanjšajo število drstnih izpuščajev in velikost dorzalne

▼M7

strani trupa pred hrbtno plavutjo pri odraslih samcih črnoglavega pisanca (26) (27). Taka splošna morfološka opažanja lahko zagotovijo koristne kvalitativne in kvantitativne informacije, ki kažejo možne zahteve za prihodnje preskušanje rib. Število in velikost drstnih izpuščajev pri črnoglavem pisancu in bradavičastih podaljškov pri medaki se lahko kvantificira neposredno ali bolj praktično na shranjenih vzorcih. Priporočeni postopki za oceno sekundarnih spolnih značilnosti pri črnoglavem pisancu in medaki so navedeni v Dodatku 5A oziroma Dodatku 5B.

Vitelogenin (VTG)

43. Kri se odvzame iz repne arterije/vene s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko ali namesto tega s srčno punkcijo z brizgo. Količine zbrane krvi so odvisne od velikosti ribe ter so običajno v območju 5–60 µl na posameznega črnoglavega pisanca in 5–15 µl na posamezno cebrico. Plazma se od krvi loči s centrifugiranjem in shrani z zaviralci proteaze pri –80 °C, dokler se pri njej ne izvede analiza vitelogenina. Alternativno se lahko pri medaki kot tkivni vir za določanje VTG uporabijo jetra in pri cebrici homogenat glave/repa (Dodatek 6). Meritev VTG mora temeljiti na validirani homologni metodi ELISA, pri čemer se uporabijo homologni standard VTG in homologna protitelesa. Priporoča se uporaba metode, s katero je mogoče zaznati tako nizke ravni VTG, kot je nekaj ng/ml plazme (ali ng/mg tkiva), kar je raven ozadja pri neizpostavljenih ribjih samcih.

44. Nadzor kakovosti analize VTG se zagotovi z uporabo standardov, slepih vzorcev in vsaj dvema analizama. Za vsako metodo ELISA je treba izvesti preskus vpliva matriksa (učinek razredčenja vzorca), da se določi najmanjši faktor razredčenja vzorca. Vsaka plošča ELISA, uporabljena za preskuse VTG, mora vsebovati naslednje vzorce za nadzor kakovosti: vsaj 6 kalibracijskih standardov, ki zajemajo območje pričakovanih koncentracij VTG, in vsaj en nespecifično vezalni preskus slepega vzorca (analiziran v dveh ponovitvah). Absorpcija teh slepih vzorcev mora biti manj kot 5 % največje absorpcije kalibracijskega standarda. Analizirana bosta vsaj dva alikvota (jamice s ponovljenimi vzorci) posameznega razredčenja vzorca. Jamice s ponovljenimi vzorci, ki se razlikujejo za več kot 20 %, je treba ponovno analizirati.

45. Korelacijski koeficient (R^2) za umeritvene krivulje mora biti večji od 0,99. Vendar visoka korelacija ni dovolj za zagotovitev ustrezne napovedi koncentracije v vseh območjih. Poleg dovolj visoke korelacije za umeritveno krivuljo mora biti koncentracija posameznega standarda, kot je izračunana po umeritveni krivulji, med 70 in 120 % nominalne koncentracije. Če se nominalne koncentracije oddaljujejo od regresijske premice kalibracije (npr. pri nižjih koncentracijah), bo umeritveno krivuljo morda treba razdeliti na nizke in visoke razpone ali uporabiti nelinearni model, ki bo ustrezal podatkom o absorpciji. Če se krivulja razdeli, mora biti R^2 na obeh delih $> 0{,}99$.

46. Meja zaznavnosti (LOD) je opredeljena kot koncentracija najnižjega analitskega standarda, meja določljivosti (LOQ) pa je opredeljena kot koncentracija najnižjega analitskega standarda, pomnoženega z najnižjim faktorjem razredčenja.

47. Vsak dan izvedbe preskusa VTG se analizira obogateni vzorec, pripravljen z med preskusnim referenčnim standardom (Dodatek 7). Razmerje med pričakovano koncentracijo in izmerjeno koncentracijo se sporoči skupaj z rezultati posameznih nizov preskusov, izvedenih isti dan.

Ocena histopatologije spolnih žlez

48. Regulativni organi lahko zahtevajo izvedbo histopatologije spolnih žlez, da se prouči ciljni organ na osi HPG po izpostavljenosti kemikaliji. Zato se spolne žleze fiksirajo cele ali secirane. Kadar je potrebna histopatologija, se pri oceni endokrinega delovanja preskusne kemikalije iščejo posebni odzivi

▼M7

na spolnih žlezah, povezani z endokrinim sistemom. Ti diagnostični odzivi vključujejo predvsem prisotnost oocitov na modih, hiperplazijo Leydigovih celic, slabše tvorjenje rumenjaka, povečanje spermatogonijev in perifolikularno hiperplazijo. Za druge lezije spolnih žlez, kot so atrezija oocitov, degeneracija mod in spremembe glede na razvojno stopnjo, lahko obstajajo različni vzroki. V dokumentu s smernicami za histopatologijo spolnih žlez rib so podrobno opredeljeni postopki, ki se uporabljajo pri seciranju, fiksiranju, odstranitvi in histopatološki oceni spolnih žlez (22).

PODATKI IN POROČANJE

Ocena odzivov biomarkerja z analizo variance

49. Za opredelitev možnega endokrinega delovanja kemikalije se z analizo variance primerjajo odzivi med tretiranimi in kontrolnimi skupinami. Kadar se uporabi kontrola s topilom, je treba za vsako končno točko izvesti primeren statistični test med vodo za redčenje in kontrolami s topilom. Smernice za obravnavanje podatkov o vodi za redčenje in kontroli s topilom pri nadaljnji statistični analizi so navedene v OECD, 2006c (28). Vse podatke o biološkem odzivu je treba analizirati in vključiti v poročilo za vsak spol posebej. Če niso izpolnjene zahtevane domneve za parametrske metode – nenormalna porazdelitev (npr. Shapiro-Wilkov test) ali heterogena varianca (Bartlettov ali Levenejev test), je potreben razmislek o preoblikovanju podatkov, da se poenotijo variance pred izvedbo analize variance ali pred izvedbo tehtane analize variance. Za nemonoton odziv na odmerek se lahko uporabi Dunnettov test (parametrski) večkratnih primerjav med pari ali Mann-Whitneyjev test z Bonferronijevo prilagoditvijo (neparametrski). Če je odziv na odmerek približno monoton, se lahko uporabijo drugi statistični testi (npr. test po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test). Za lažjo izbiro najprimernejšega statističnega testa je v Dodatku 8 zagotovljen diagram poteka za statistično analizo. Dodatne informacije so na voljo tudi v dokumentu OECD z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“ (ang. *Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*) (28).

Poročanje o rezultatih preskusa

50. Podatki študije morajo vključevati naslednje:

Preskusni laboratorij:

— odgovorno osebje in njihove obveznosti v zvezi s študijo;

— vsak laboratorij mora dokazati usposobljenost s sklopom reprezentativnih kemikalij.

Preskusna kemikalija:

— opredelitev lastnosti preskusne kemikalije;

— fizikalno stanje in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— metoda in pogostost priprave preskusnih koncentracij;

— informacije o stabilnosti in biološki razgradljivosti.

Topilo:

— opredelitev lastnosti topila (vrsta, uporabljena koncentracija);

— utemeljitev izbire topila (če to ni voda).

▼M7

Preskusne živali:

— vrsta in sev;

— dobavitelj in specifični objekt dobavitelja;

— starost rib na začetku preskusa in razmnoževalno stanje/stanje drstenja;

— podrobnosti o postopku aklimatizacije živali;

— telesna teža rib na začetku izpostavljenosti (iz podvzorca staleža rib).

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (vrsta preskusa, stopnja obremenitve, gostota rib itd.);

— metoda priprave osnovnih raztopin in pretok;

— nominalne preskusne koncentracije, tedensko izmerjene koncentracije preskusnih raztopin in uporabljena analitska metoda, sredine izmerjenih vrednosti in standardnih odklonov v preskusnih posodah ter dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;

— značilnosti vode za redčenje (vključno s pH, trdoto, alkalnostjo, temperaturo, koncentracijo raztopljenega kisika, ravnmi preostalega klora, skupnim organskim ogljikom, suspendiranimi trdnimi snovmi in drugimi izvedenimi meritvami);

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH, trdota, temperatura in koncentracija raztopljenega kisika;

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost dajanja ter analiza zadevnih onesnaževal, če je na voljo (npr. PCB, PAH in organoklorni pesticidi)).

Rezultati:

— dokazi, da kontrole izpolnjujejo merila za sprejemljivost preskusa;

— podatki o smrtnosti za posamezne preskusne koncentracije in kontrole;

— uporabljene tehnike statistične analize, obdelava podatkov in utemeljitev uporabljenih tehnik;

— podatki o bioloških opažanjih splošne morfologije, vključno s sekundarnimi spolnimi značilnostmi, proizvajanjem iker in VTG;

— rezultati analiz podatkov, po možnosti v obliki tabel in grafov;

— pojav kakršnih koli neobičajnih reakcij rib in kakršnih koli vidnih učinkov, ki jih povzroči preskusna kemikalija.

▼M7

SMERNICE ZA RAZLAGO IN SPREJEMLJIVOST REZULTATOV PRESKUSA

51. V tem razdelku je navedenih nekaj preudarkov, ki jih je treba upoštevati pri razlagi rezultatov preskusa za različne izmerjene končne točke. Rezultate je treba razlagati previdno, kadar se zdi, da preskusna kemikalija povzroča očitno toksičnost ali vpliva na splošno stanje preskusne živali.

52. Pri določanju območja preskusnih koncentracij je treba paziti, da se ne preseže najvišja tolerančna koncentracija, da bo mogoča smiselna razlaga podatkov. Kadar ni znakov toksičnih učinkov, je pomembno, da se izvede vsaj eno tretiranje. Znake bolezni in znake toksičnih učinkov je treba temeljito oceniti in o njih poročati. Možno je na primer, da na nastajanje VTG pri samicah vplivajo tudi splošna toksičnost in neendokrini toksični načini delovanja, npr. hepatotoksičnost. Vendar se lahko razlaga učinkov podkrepi z drugimi stopnjami tretiranja, na katere ne vpliva sistemska toksičnost.

53. V zvezi s sprejemljivostjo rezultatov preskusa je treba upoštevati nekaj vidikov. Ravni VTG v kontrolnih skupinah samcev in samic morajo biti praviloma izrazite ter ločene za približno tri rede velikosti pri črnoglavem pisancu in cebrici ter približno en red velikosti pri medaki. Primeri območja vrednosti v kontrolnih in tretiranih skupinah so navedeni v validacijskih poročilih (1) (2) (3) (4). Visoke vrednosti VTG pri kontrolnih samcih bi lahko ogrozile odzivnost preskusa in njegovo zmožnost zaznavanja šibkih agonistov estrogena. Nizke vrednosti VTG pri kontrolnih samicah bi lahko ogrozile odzivnost preskusa ter njegovo zmožnost zaznavanja zaviralcev aromataze in antagonistov estrogena. Pri pripravi zadevnih smernic so bile uporabljene validacijske študije.

54. Pri kvantifikaciji proizvajanja iker lahko pride do pomembnih variacij [koeficient variacije (KV) je lahko v območju 20–60 %], ki omejujejo zmožnost preskusa za zaznavanje statistično značilnega zmanjšanja proizvajanja iker, manjšega od 70 %, ko se KV približa 50 % ali jih preseže. Kadar je KV omejen na nižje vrednosti (približno 20–30 %), ima preskus sprejemljivo moč (80 %) zaznavanja 40–50-odstotnega zmanjšanja proizvajanja iker. Zasnova preskusa, ki se uporablja za črnoglavega pisanca in vključuje štiri ponovljene vzorce na stopnjo tretiranja, bi morala omogočati večjo moč za končno točko plodnosti v primerjavi z zasnovo preskusa z le dvema ponovljenima vzorcema.

55. Če laboratorij še ni izvedel preskusa ali je prišlo do znatnih sprememb (npr. sprememba seva ali dobavitelja rib), se priporoča izvedba študije tehnične usposobljenosti. Priporočljivo je, da se uporabijo kemikalije, ki zajemajo različne načine delovanja ali vplive na številne preskusne končne točke. V praksi se spodbuja, naj vsak laboratorij vzpostavi lastne podatke o kontrolah iz preteklih preskusov za samce in samice ter pozitivno kontrolo za estrogeno delovanje (npr. 17β-estradiol pri 100 ng/l ali znan šibek agonist), ki povzroči povečanje VTG pri ribjih samcih, pozitivno kontrolo za zaviranje aromataze (npr. fadrozol ali prokloraz pri 300 µg/l), ki povzroči zmanjšanje VTG pri ribjih samicah, in pozitivno kontrolo za androgeno delovanje (npr. 17β-trenbolon pri 5 µg/l), ki povzroči indukcijo sekundarnih spolnih značilnosti pri samicah črnoglavega pisanca in medake. Vsi ti podatki se lahko primerjajo z razpoložljivimi podatki iz validacijskih študij (1) (2) (3), da se zagotovi usposobljenost laboratorija.

56. Na splošno je treba meritve VTG šteti za pozitivne, če je pri samcih prišlo do statistično značilnega povečanja ($p < 0,05$) ali pri samicah do statistično značilnega zmanjšanja ($p < 0,05$) vsaj pri največjem preskušenem odmerku v

▼M7

primerjavi s kontrolno skupino ter ob odsotnosti znakov splošne toksičnosti. Pozitiven rezultat je nadalje podprt s prikazom biološko verjetnega razmerja med odmerkom in krivuljo odziva. Kot je bilo navedeno, zmanjšanje VTG morda ni v celoti endokrinega izvora; vendar je treba pozitiven rezultat na splošno razlagati kot dokaz endokrinega delovanja *in vivo* ter si prizadevati za nadaljnjo pojasnitev.

57. Regulativni organi lahko zahtevajo oceno histopatologije spolnih žlez, da se določi, ali so preskusne živali sposobne za razmnoževanje, in da se omogoči ocena zanesljivosti dokazov pri rezultatih preskusov. Izvedba histopatologije spolnih žlez morda ne bo potrebna, kadar so VTG ali sekundarne spolne značilnosti pozitivne (tj. povečanje ali zmanjšanje VTG ali indukcija sekundarnih spolnih značilnosti).

VIRI

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 60, Pariz.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 61, Pariz.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 78, Pariz.

(4) Owens, J. W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (prevzeto 18.9.2008).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15. december 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 104 str.

(6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 94, Pariz.

(7) Sumpter, J. P. in S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives, zv. 103/Dop. 7:173–8 Review.

(8) Pawlowski, S. *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology, zv. 68(3): 277–91.

(9) Andersen, L. *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, zv. 76(3–4): 343–52.

(10) Ankley, G. T. *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences, 67(1): 121–30.

▼M7

(11) Panter, G. H. *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology, zv. 70(1): 11–21.

(12) Parks, L. G. *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology, 123(2): 113–25.

(13) Panter, G. H. *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruselj, Belgija.

(14) Fenske, M. *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217–232.

(15) Holbech, H. *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology, 130: 119–131.

(16) Rose, J. *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531–539.

(17) Brion, F. *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry, zv. 21: 1699–1708.

(18) Yokota, H. *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4: 87–98.

(19) Tatarazako, N. *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301–308.

(20) Ankley, G. T. *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry, 22(6): 1350–60.

(21) Seki, M. *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry, 23(3): 774–81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, št. 123, Pariz.

(23) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, št. 23, Pariz.

(24) Hutchinson, T. H. *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, zv. 76, str. 69–92.

(25) Hutchinson, T. H. *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives, zv. 114/Dop. 1: 106–14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson, S. R. *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129–145.

(27) Martinovic, D. *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478–488.

(28) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD, Pariz.

(29) US EPA (2008). Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, z dne 30. januarja 2008. US Environmental Protection Agency, Washington DC, 110 str.

(30) OECD (2012). *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 150, OECD, Pariz.

▼**M7**

Dodatek 1

OKRAJŠAVE IN OPREDELITEV POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

KV: koeficient variacije.

ELISA: encimski imunski test (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os HPG: os hipotalamus – hipofiza – spolne žleze.

Stopnja obremenitve: mokra teža rib na prostornino vode.

MTC: najvišja tolerančna koncentracija, ki predstavlja približno 10 % LC_{50}.

Gostota rib: število rib na prostornino vode.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikobeljakovina in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

▼M7

Dodatek 2

PRESKUSNI POGOJI ZA PRESEJALNI ENDOKRINI PRESKUS RIB

1. Priporočene vrste	Črnoglavi pisanec (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Cebrica (*Danio rerio*)
2. Vrsta preskusa	pretočni	pretočni	pretočni
3. Temperatura vode	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kakovost osvetlitve	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)	fluorescenčne sijalke (široki spekter)
5. Jakost svetlobe	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju)
6. Obdobje osvetljenosti (svitanje in mrak sta neobvezna, vendar se ne štejeta za potrebna)	16 ur svetlobe, 8 ur teme	12–16 ur svetlobe, 12–8 ur teme	12–16 ur svetlobe, 12–8 ur teme
7. Stopnja obremenitve	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Velikost preskusne komore	10 l (vsaj)	2 l (vsaj)	5 l (vsaj)
9. Količina preskusne raztopine	8 l (vsaj)	1,5 l (vsaj)	4 l (vsaj)
10. Zamenjave količin preskusnih raztopin	vsaj 6 na dan	vsaj 5 na dan	vsaj 5 na dan
11. Starost preskusnih organizmov	glej odstavek 21	glej odstavek 21	glej odstavek 21
12. Približna mokra teža odrasle ribe (g)	samice: 1,5 ± 20 % samci: 2,5 ± 20 %	samice: 0,35 ± 20 % samci: 0,35 ± 20 %	samice: 0,65 ± 20 % samci: 0,4 ± 20 %
13. Št. rib na preskusno posodo	6 (2 samca in 4 samice)	6 (3 samci in 3 samice)	10 (5 samcev in 5 samic)
14. Št. tretiranj	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)	= 3 (plus ustrezno št. kontrol)
15. Št. posod na tretiranje	najmanj 4	najmanj 4	najmanj 2
16. Št. rib na preskusno koncentracijo	16 odraslih samic in 8 samcev (4 samice in 2 samca v vsaki ponovitveni posodi)	12 odraslih samic in 12 samcev (3 samice in 3 samci v vsaki ponovitveni posodi)	10 odraslih samic in 10 samcev (5 samice in 5 samcev v vsaki ponovitveni posodi)
17. Način hranjenja	živi ali zamrznjeni odrasli solinski rakci ali njihovi navpliji dvakrat ali trikrat na dan (*ad libitum*), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega	navpliji morskih rakcev dvakrat ali trikrat na dan (*ad libitum*), komercialno razpoložljiva hrana ali kombinacija navedenega	navpliji solinskih rakcev dvakrat ali trikrat na dan (*ad libitum*), komercialno dostopna hrana ali kombinacija navedenega

▼M7

18. Prezračevanje	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti z zrakom	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti z zrakom	brez, razen če koncentracija raztopljenega kisika pade pod 60 % nasičenosti z zrakom
19. Voda za redčenje	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda	čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda
20. Obdobje pred izpostavljenostjo	priporočeno 7–14 dni	priporočeno 7–14 dni	priporočeno 7–14 dni
21. Trajanje izpostavljenosti kemikaliji	21 dni	21 dni	21 dni
22. Biološke končne točke	— preživetje — vedenje — plodnost — 2y spolne značilnosti — VTG — histopatologija spolnih žlez (neobvezno)	— preživetje — vedenje — plodnost — 2y spolne značilnosti — VTG — histopatologija spolnih žlez (neobvezno)	— preživetje — vedenje — plodnost — VTG — histopatologija spolnih žlez (neobvezno)
23. Sprejemljivost preskusa	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja vrednost temperature 25 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v območju 20 % srednje vrednosti meritev na stopnjo tretiranja	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja vrednost temperature 25 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v območju 20 % srednje vrednosti meritev na stopnjo tretiranja	raztopljeni kisik > 60 % nasičenosti; srednja vrednost temperature 26 ± 2 °C; 90-odstotno preživetje rib v kontrolah; izmerjene preskusne koncentracije v območju 20 % srednje vrednosti meritev na stopnjo tretiranja

▼**M7**

Dodatek 3

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

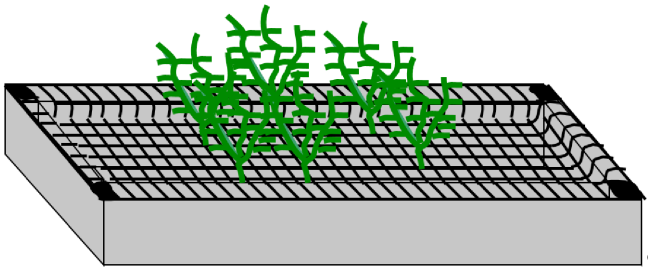
SESTAVINA	KONCENTRACIJE
delci	< 20 mg/l
skupni organski ogljik	< 2 mg/l
neionizirani amonijak	< 1 µg/l
preostali klor	< 10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	< 50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	< 50 ng/l
skupni organski klor	< 25 ng/l

▼M7

Dodatek 4A

SUBSTRAT ZA DRSTENJE CEBRICE

Drstilni pladenj: popolnoma steklena laboratorijska posoda, na primer 22 x 15 x 5,5 cm (d x š x g), pokrita z odstranljivo rešetko iz nerjavnega jekla (širina mreže 2 mm). Rešetka mora prekriti odprtino laboratorijske posode pod robom.



Na rešetko je treba pritrditi substrat za drstenje. Zagotoviti mora strukturo, v katero se lahko premaknejo ribe. Primerne so na primer umetne akvarijske rastline iz zelene plastike (opomba: proučiti je treba morebitno adsorpcijo preskusne kemikalije na plastičnem materialu). Plastični material je treba dovolj dolgo izpirati v zadostni količini tople vode za zagotovitev, da v preskusno vodo ne bo prešla nobena kemikalija. Pri uporabi steklenih materialov je treba zagotoviti, da se ribe med intenzivnim premikanjem ne poškodujejo in niso utesnjene.

Razdalja med pladnjem in steklenimi ploščami mora biti vsaj 3 cm za zagotovitev, da se ribe ne drstijo zunaj pladnja. Ikre, odložene na pladenj, padejo skozi rešetko in se lahko vzorčijo 45–60 minut po začetku osvetlitve. Prozorne ikre niso sprijete in se lahko enostavno štejejo z uporabo prečne svetlobe. Če je v posodi pet samic, se do 20 iker na dan lahko šteje za nizko število, do 100 iker kot srednje in več kot 100 iker kot visoko število. Drstilni pladenj je treba odstraniti, zbrati ikre in drstilni pladenj ponovno postaviti v preskusno posodo čim pozneje zvečer ali zelo zgodaj zjutraj. Čas do ponovne postavitve rešetke ne sme presegati ene ure, saj bi sicer lahko substrat za drstenje spodbudil posamezna parjenja in drstenja ob neobičajnem času. Če je treba zaradi razmer drstilni pladenj vstaviti pozneje, je treba to storiti vsaj 9 ur po začetku osvetljenosti. Drstenje se tako pozno ne začne več.

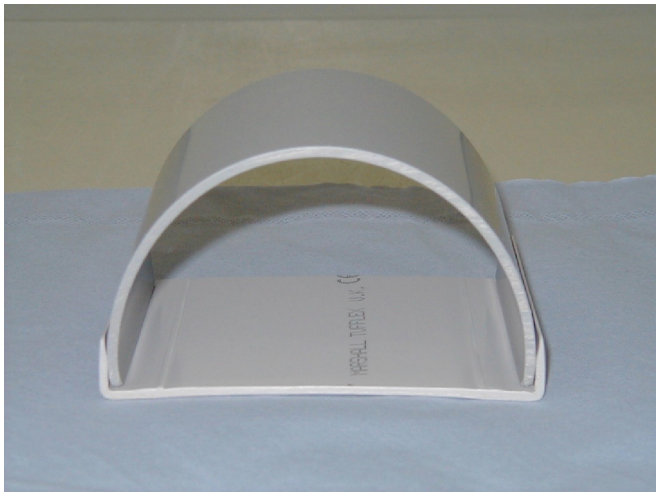
▼M7

Dodatek 4B

SUBSTRAT ZA DRSTENJE ČRNOGLAVEGA PISANCA

V vsako preskusno komoro se postavijo dve ali tri kombinirane plastične/keramične/steklene plošče ali plošče iz nerjavnega jekla in drstilni pladnji (npr. 80 mm dolg siv polkrožen žleb na pladenj z robovi, dolg 130 mm) (glej sliko). Ustrezno pripravljene plošče iz PVC ali keramike so dokazano primerne za substrat za drstenje (Thorpe *et al.* 2007).

Priporočeno je, da so plošče obrušene, da se izboljša oprijem. Pladenj mora biti tudi zaščiten, da se ribam prepreči dostop do iker, ki padejo skozi, razen če je bil pri uporabljenem substratu za drstenje dokazan učinkovit oprijem.



Podlaga je zasnovana tako, da zadrži vse ikre, ki se ne primejo površine plošče in bi zato padle na dno akvarija (ali tiste ikre, ki so odložene neposredno na ravno plastično podlago). Vse substrate za drstenje je treba pred uporabo vsaj 12 ur izpirati v vodi za redčenje.

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T. H., Tyler, C. R., 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, zv. 81, 90–98.

▼M7

Dodatek 5A

OCENA SEKUNDARNIH SPOLNIH ZNAČILNOSTI PRI ČRNOGLAVEM PISANCU ZA ZAZNAVANJE NEKATERIH KEMIKALIJ Z ENDOKRINIM DELOVANJEM

Pregled

Potencialno pomembne značilnosti fizičnega videza odraslih črnoglavih pisancev pri preskušanju povzročiteljev endokrinih motenj vključujejo barvo telesa (tj. svetla/temna), vzorce obarvanja (tj. prisotnost ali odsotnost navpičnih prog), obliko telesa (tj. oblika glave in območja prsi, napetost trebuha) in posebne sekundarne spolne značilnosti (tj. število in velikost drstnih izpuščajev, velikost dorzalne strani trupa pred hrbtno plavutjo in leglice).

Drstni izpuščaji so na glavi (dorzalna stran trupa pred hrbtno plavutjo) razmnoževalno aktivnih samcev črnoglavega pisanca in so običajno razporejeni v dvostransko simetrični vzorec (Jensen *et al.* 2001). Kontrolne samice ter mladi samci in samice razvoja izpuščajev ne kažejo (Jensen *et al.* 2001). Okoli oči in med nosnicama samcev je lahko do osem posameznih izpuščajev. Največ izpuščajev in največji izpuščaji so v dveh vzporednih linijah neposredno pod nosnicama in nad usti. Pri številnih ribah so skupine izpuščajev pod spodnjo čeljustjo; izpuščaji, ki so najbliže ustom, se običajno pojavljajo kot par, medtem ko lahko bolj ventralni sklop sestavljajo do štirje izpuščaji. Dejansko število izpuščajev je redko večje od 30 (območje 18–28; Jensen *et al.* 2001). Prevladujoči izpuščaji (v smislu števila) so prisotni kot posamezne, razmeroma okrogle strukture, katerih višina je približno enaka polmeru. Večina razmnoževalno aktivnih samcev ima tudi vsaj nekaj izpuščajev, ki so večji in izraziti, da jih ni mogoče razlikovati kot posamezne strukture.

Nekatere vrste kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje, lahko povzročijo nenormalen pojav nekaterih sekundarnih spolnih značilnosti pri nasprotnem spolu; na primer, agonisti receptorjev za androgene, kot je 17α-metiltestosteron ali 17β-trenbolon, lahko povzročijo razvoj drstnih izpuščajev pri samicah črnoglavega pisanca (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001, 2003), medtem ko lahko agonisti receptorjev za estrogene zmanjšajo število ali velikost drstnih izpuščajev pri samcih (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

V nadaljevanju je naveden opis opredelitve lastnosti drstnih izpuščajev pri črnoglavem pisancu na podlagi postopkov, uporabljenih v laboratoriju Agencije ZDA za varstvo okolja v Duluthu (Minnesota). Posebni izdelki in/ali oprema se lahko nadomestijo s primerljivimi materiali, ki so na voljo.

Opazovanje je najboljše z uporabo osvetljenega povečevalnega stekla ali trikratno osvetljenega stereomikroskopa. Ribe se opazujejo dorzalno in anteriorno naprej (glava proti opazovalcu).

— Ribe se postavijo v majhno petrijevko (npr. s premerom 100 mm) anteriorno naprej in ventralno navzdol. Iskalo se usmeri tako, da se omogoči prepoznavanje izpuščajev. Za določitev območij z izpuščaji se riba nežno in počasi obrne z ene strani na drugo. Izpuščaji se preštejejo in ocenijo.

— Opazovanje se ponovi na ventralni površini glave, tako da se riba v petrijevko postavi dorzalno anteriorno naprej.

— Opazovanje posamezne ribe je treba zaključiti v 2 minutah.

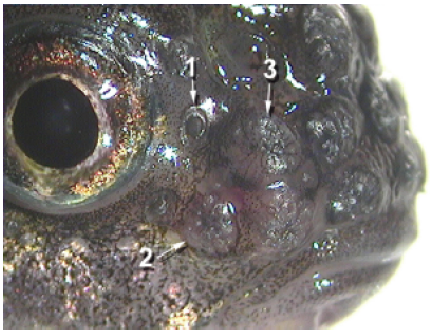
▼M7

Štetje in ocenjevanje izpuščajev

Za ocenjevanje prisotnosti in razvoja izpuščajev pri odraslih črnoglavih pisancih je bilo opredeljenih šest specifičnih območij. Za določitev lokacije in števila prisotnih izpuščajev je bila pripravljena predloga (glej konec tega dodatka). Število izpuščajev se zapiše, njihova velikost pa se lahko za vsak organizem kvantitativno razvrsti, kot sledi: 0 – odsoten, 1 – prisoten, 2 – povečan in 3 – izrazit (slika 1).

Ocena 0 – odsotnost izpuščajev. Ocena 1 – prisoten, tj. vsak izpuščaj z eno točko, pri kateri je višina skoraj enaka polmeru. Ocena 2 – povečan, tj. tkivo, ki je po videzu podobno zvezdici in ima običajno veliko zvezdasto osnovo z brazdami ali gubami, ki izhajajo iz središča. Izpuščaj je v višjem delu pogosto bolj nazobčan, vendar je lahko občasno nekoliko zaokrožen. Ocena 3 – izrazit, tj. običajno razmeroma velik in zaokrožen izpuščaj z manj definirano strukturo. Ti izpuščaji so občasno skupaj in tvorijo celoto s posameznimi ali kombiniranimi območji (B, C in D, opisana v nadaljevanju). Obarvanost in oblika sta podobni kot pri oceni 2, vendar sta občasno razmeroma nedoločljivi. S tem ocenjevalnim sistemom je skupna ocena izpuščajev običajno < 50 pri normalnih kontrolnih samcih s številom izpuščajev od 18 do 20 (Jensen *et al.* 2001).

Slika 1



Dejansko število izpuščajev je lahko pri nekaterih ribah večje od polj v predlogi za določeno območje ocenjevanja. V tem primeru se lahko označijo dodatne ocene, in sicer desno ali levo od polja. Zato ni treba, da je predloga simetrična. Dodatna tehnika označevanja izpuščajev, ki so v parih ali združeni navpično ob vodoravni ravnini ust, se lahko izvede z dvojnim označevanjem dveh ocen izpuščajev v enem polju.

Območja označevanja:

A – izpuščaji okoli oči. Označeni dorzalno do ventralno okoli anteriornega očesnega obroča. Pri odraslih kontrolnih samcih jih je pogosto več, pri kontrolnih samicah jih ni, na splošno so v parih (en blizu vsakega očesa) ali sami pri samicah, izpostavljenih androgenom.

B – izpuščaji med nosnicama (pore senzornega kanala). Pri kontrolnih samcih v višjih razvojnih stopnjah so običajno v parih (2 – povečani ali 3 – izraziti). Niso prisotni pri kontrolnih samicah, pri čemer se pojavljajo in razvijajo pri samicah, izpostavljenih androgenom.

C – izpuščaji neposredno anteriorno od nosnic, vzporedno z usti. Pri odraslih kontrolnih samcih so običajno povečani ali izraziti. Pri manj razvitih samcih ali samicah, tretiranih z androgenom, so prisotni ali povečani.

▼M7

D – izpuščaji vzporedno z ustno linijo. Pri kontrolnih samcih so običajno ocenjeni kot razviti. Pri kontrolnih samicah niso prisotni, vendar so prisotni pri samicah, izpostavljenih androgenom.

E – izpuščaji na spodnji čeljusti, blizu ust, so običajno majhni in pogosto v parih. Pri kontrolnih ali tretiranih samcih in tretiranih samicah se razlikujejo.

F – izpuščaji, locirani ventralno od E. Pogosto so majhni in v parih. Prisotni so pri kontrolnih samcih in samicah, izpostavljenih androgenom.

Viri

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem*, št. 20: 1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., Gray, E. L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem*, št. 22: 1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem*, št. 34: 3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., Ankley, G. T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C*, št. 128: 127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., Ankley, G. T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol*, št. 59: 515–523.

(6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol*, št. 47: 129–145.

(7) Smith, R. J. F. (1974). Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool*, št. 52: 1031–1038.

Predloga za izpuščaje:

Oznaka _____

Datum _____

Skupna ocena _____

Številska ocena

1- prisoten

2- povečan

3- izrazit

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Dodatek 5B

OCENA SEKUNDARNIH SPOLNIH ZNAČILNOSTI PRI MEDAKI ZA ZAZNAVANJE NEKATERIH KEMIKALIJ Z ENDOKRINIM DELOVANJEM

V nadaljevanju je naveden opis meritve bradavičastih podaljškov ([1]), ki so sekundarna spolna značilnost pri medaki (*Oryzias latipes*).

(1) Po odstranitvi jeter (Dodatek 6) se telo postavi v konično epruveto, ki vsebuje približno 10 ml 10-odstotnega nevtralno pufranega formalina (glava navzgor in rep navzdol). Če so spolne žleze fiksirane v raztopini, ki ni 10-odstotni nevtralno pufran formalin, se z rezilom naredi prečni rez čez telo med anteriornim območjem predrepne plavuti in anusom, pri čemer je treba paziti, da se ne poškodujejo gonopora in spolne žleze (slika 3). Kranialna stran telesa ribe se vstavi v fiksirno raztopino, da se ohranijo spolne žleze, repna stran telesa ribe pa se vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin, kot je opisano zgoraj.

(2) Ko se telo ribe vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin, se anteriorno območje predrepne plavuti prime s pinceto in za približno 30 sekund prepogne, da je predrepna plavut odprta. Pri prijemu predrepne plavuti s pinceto se nekaj plavutnic v anteriornem območju previdno prime, da se bradavičasti podaljški ne opraskajo.

(3) Ko je predrepna plavut približno 30 sekund odprta, se telo ribe shrani v 10-odstotnem nevtralno pufranem formalinu pri sobni temperaturi do meritve bradavičastih podaljškov (meritev je treba izvesti po vsaj 24-urni fiksaciji).

Merjenje

(1) Po vsaj 24-urni fiksaciji telesa ribe v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu se telo ribe vzame iz konične epruvete in formalin obriše s filtrirnim papirjem (ali papirnato brisačo).

(2) Riba se obrne s trebušno stranjo navzgor. Nato se predrepna plavut previdno odreže z majhnimi secirnimi škarjami (predrepna plavut se po možnosti odreže z nekaj radii (*pterygiophore*)).

(3) Anteriorni del odrezane predrepne plavuti se prime s pinceto in položi na objektno stekelce z nekaj kapljicami vode. Nato se predrepna plavut prekrije s krovnim stekelcem. Med prijemanjem predrepne plavuti s pinceto je treba paziti, da se bradavičasti podaljški ne opraskajo.

(4) S števcem se pod biološkim mikroskopom (pokončni mikroskop ali obrnjeni mikroskop) prešteje število ploščic z bradavičastimi podaljški. Bradavičasti podaljški se prepoznajo, če je na posteriornem robu ploščice vidna majhna tvorba podaljškov. Na delovni list se zapiše število ploščic z bradavičastimi podaljški na vsaki plavutnici (npr. prva plavutnica: 0, druga plavutnica: 10,

([1]) Bradavičasti podaljški se običajno pojavijo le pri odraslih samcih na plavutnicah, in sicer od druge do sedme ali osme s posteriornega konca predrepne plavuti (sliki 1 in 2). Vendar se podaljški redko pojavijo na prvi plavutnici s posteriornega konca predrepne plavuti. Ta standardni operativni postopek zajema meritev podaljškov na prvi plavutnici (v tem standardnem operativnem postopku se številka plavutnice nanaša na zaporedje od posteriornega konca predrepne plavuti).

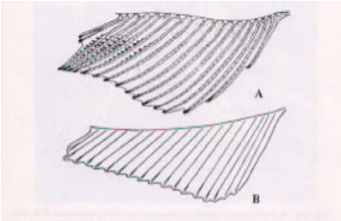
▼M7

tretja plavutnica: 12 itd.), vsota teh števil po posameznih ribah pa se vnese v Excelovo preglednico. Po potrebi se predrepna plavut fotografira in na fotografiji prešteje število ploščic z bradavičastimi podaljški.

(5) Po meritvi se predrepna plavut vstavi v konično epruveto, opisano v (1), in shrani.

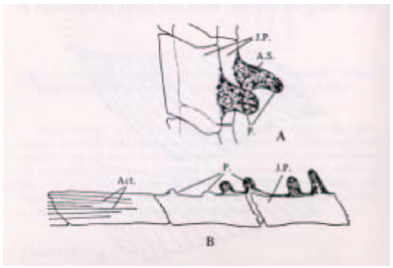
Slika 1

Diagram, na katerem so prikazane razlike v obliki in velikosti predrepne plavuti glede na spol. A: samec, B: samica. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



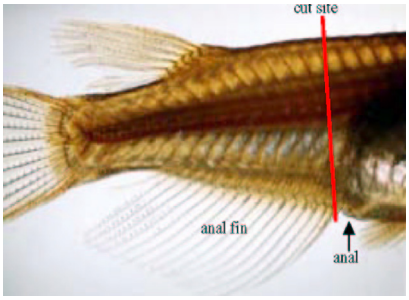
Slika 2

A: podaljški na ploščicah predrepne plavutnice, J.P.: ploščica, A.S.: aksialni prostor, P.: podaljšek, B: distalna okončina plavutnice. Actinotrichia (Act.) so na vrhu. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



Slika 3

Fotografija telesa ribe, na kateri je prikazana stran reza, če so spolne žleze fiksirane v raztopini za fiksiranje, ki ni 10-odstotni nevtralno pufran formalin. V tem primeru se preostalo telo z rezilom (rdeča) prereže med anteriornim delom predrepne plavuti in anusom, sprednji del ribe se vstavi v raztopino za fiksiranje spolnih žlez, zadnji del ribe pa se vstavi v 10-odstotni nevtralno pufran formalin.



▼M7

Dodatek 6

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA ODVZEM VZORCEV ZA ANALIZO VITELOGENINA

Preprečiti je treba navzkrižno kontaminacijo med vzorci VTG samcev in samic.

Postopek 1A: Črnoglavi pisanec, odvzem krvi iz repne vene/arterije

Po anesteziji se repno steblo delno prereže z rezilom skalpela, pri čemer se kri odvzame iz repne vene/arterije s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko. Ko je kri odvzeta, se plazma hitro izolira s 3-minutnim centrifugiranjem pri 15 000 *g* (ali z 10-minutnim centrifugiranjem pri 15 000 *g* in 4 °C). Po želji se lahko po centrifugiranju določi odstotek hematokrita. Plazemski del se nato odstrani iz mikrohematokritske cevke in shrani v centrifugalni epruveti z 0,13 enotami aprotinina (zaviralec proteaze) pri –80 °C, dokler ni mogoče določiti VTG. Glede na velikost črnoglavega pisanca (ki je odvisna od spola) se običajno lahko odvzame od 5 do 60 mikrolitrov plazme na ribo (Jensen *et al.* 2001).

Postopek 1B: Črnoglavi pisanec, odvzem krvi iz srca

Namesto tega se lahko kri odvzame tudi s srčno punkcijo s heparinizirano brizgo (1 000 enot heparina na ml). Kri se prenese v Eppendorfove epruvete (shranjene na ledu) in nato centrifugira (5 minut, 7 000 *g*, sobna temperatura). Plazmo je treba prenesti v čiste Eppendorfove epruvete (v alikvotih, če količina plazme to omogoča) in takoj zamrzniti pri –80 °C, dokler se ne analizira (Panter *et al.* 1998).

Postopek 2A: Japonska medaka, odstranitev jeter pri medaki

Odstranitev preskusne ribe iz preskusne komore

(1) Preskusno ribo je treba iz preskusne komore odstraniti z lovilno mrežico. Paziti je treba, da preskusna riba ne pade v druge preskusne komore.

(2) Načeloma je treba preskusne ribe odstraniti po naslednjem vrstnem redu: kontrola, kontrola s topilom (kadar je to ustrezno), najnižja koncentracija, srednja koncentracija, najvišja koncentracija in pozitivna kontrola. Poleg tega je treba odstraniti vse samce iz ene preskusne komore, preden se odstranijo preostale samice.

(3) Spol posamezne preskusne ribe se določi na podlagi zunanjih spolnih značilnosti (npr. oblike predrepne plavuti).

(4) Preskusna riba se vstavi v posodo za prenos in prenese na delovno postajo za odstranitev jeter. Preveri se, ali so oznake preskusne komore in posode za prenos točne, ter potrdi, da sta število rib, ki so bile odstranjene iz preskusne komore, in število rib, ki ostanejo v preskusni komori, skladni s pričakovanji.

(5) Če spola ni mogoče določiti na podlagi zunanjega videza rib, se iz preskusne komore odstranijo vse ribe. V tem primeru je treba spol določiti z opazovanjem spolnih žlez ali sekundarnih spolnih značilnosti pod stereomikroskopom.

Odstranitev jeter

(1) Preskusna riba se iz posode za prenos z lovilno mrežico prenese v raztopino za anestezijo.

▼M7

(2) Ko je preskusna riba anestezirana, se s pinceto (za splošno rabo) prenese na filtrirni papir (ali papirnato brisačo). S pinceto se prime glava preskusne ribe, da se prepreči poškodba repa.

(3) S površine preskusne ribe se s filtrirnim papirjem (ali papirnato brisačo) obriše voda.

(4) Riba se obrne s trebušno stranjo navzgor. Nato se z majhnimi secirnimi škarjami naredi majhen prečni rez na sredini med ventralnim delom vratu in srednjim trebušnim delom.

(5) V majhni rez se vstavijo secirne škarje, s katerimi se zareže v trebuh od točke pod škržnim plaščem do kranialne strani anusa po sredini trebuha. Paziti je treba, da se secirne škarje ne vstavijo preglboko, s čimer se prepreči poškodba jeter in spolnih žlez.

(6) Pod stereomikroskopom se izvedejo naslednji postopki.

(7) Preskusna riba se s trebušno stranjo navzgor postavi na papirnato brisačo (pri roki imejte tudi petrijevko ali objektno stekelce).

(8) Stene trebušne votline se razprejo z natančno pinceto, notranji organi pa se eksteriorizirajo. Po potrebi je sprejemljiva tudi eksteriorizacija notranjih organov z odstranitvijo ene strani stene trebušne votline.

(9) Z drugo natančno pinceto se izpostavijo jetra in žolčnik. Nato se prime žolčevod in odreže žolčnik. Paziti je treba, da se žolčnik ne poškoduje.

(10) Na enak način se prime požiralnik in prebavni trakt odreže od jeter. Paziti je treba, da iz prebavnega trakta ne uide vsebina. Odreže se repni prebavni trakt od anusa in odstrani trakt iz trebušne votline.

(11) Z obrobja jeter se odrežeta masa maščobe in drugo tkivo. Paziti je treba, da se jetra ne opraskajo.

(12) Z natančno pinceto se prime jetrno portalno polje, jetra pa se odstranijo iz trebušne votline.

(13) Jetra se položijo na objektno stekelce. Po potrebi se s površine jeter z natančno pinceto odstranita vsa preostala maščoba in nepripadajoče tkivo (npr. trebušna mrena).

(14) Teža jeter se izmeri s tarirano 1,5-mililitrsko mikroepruveto z uporabo elektronske analitske tehtnice. Vrednost se zapiše na delovni list (na 0,1 mg natančno). Potrdijo se identifikacijski podatki na nalepki mikroepruvete.

(15) Pokrov mikroepruvete z jetri se zapre. Shrani se na rešetki za hlajenje (ali rešetki za zamrzovanje).

(16) Po odstranitvi enih jeter se instrumenti za seciranje očistijo ali nadomestijo s čistimi.

▼M7

(17) Jetra se iz vseh rib v posodi za prenos odstranijo, kot je opisano zgoraj.

(18) Ko se jetra odstranijo iz vseh rib v posodi za prenos (tj. vseh samcev ali samic v preskusni komori), se vsi vzorci jeter postavijo na stojalo za epruvete z identifikacijsko nalepko in shranijo v zamrzovalniku. Če se jetra donirajo za predhodno tretiranje kmalu po odstranitvi, se vzorci prenesejo na naslednjo delovno postajo na hladilnem (ali zamrzovalnem stojalu).

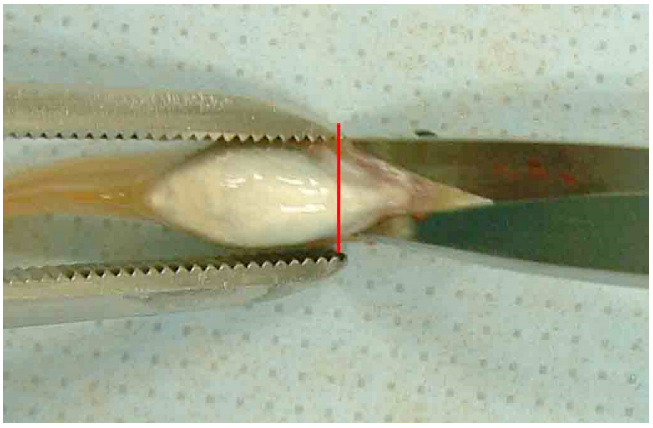
Po odstranitvi jeter je telo ribe na voljo za histologijo spolnih žlez in meritev sekundarnih spolnih značilnosti.

Vzorec

Vzorci jeter, odvzeti pri preskusnih ribah, se shranijo pri ≤ –70 °C, če se ne uporabijo za predhodno tretiranje kmalu po odstranitvi.

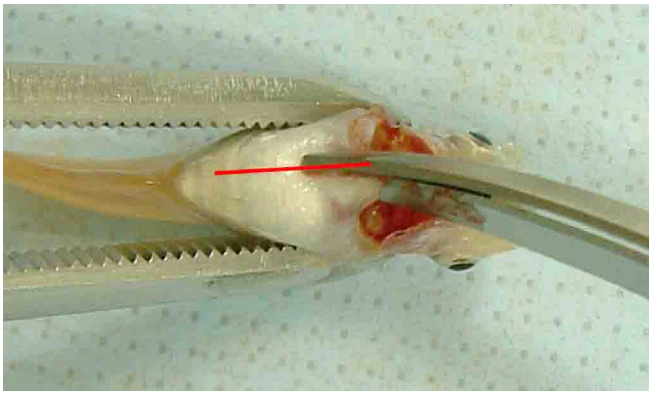
Slika 1

Rez se naredi s škarjami neposredno anteriorno od prsne plavuti.



Slika 2

Po sredinski črti trebuha se s škarjami zareže do točke, ki se nahaja približno 2 mm kranialno od anusa.



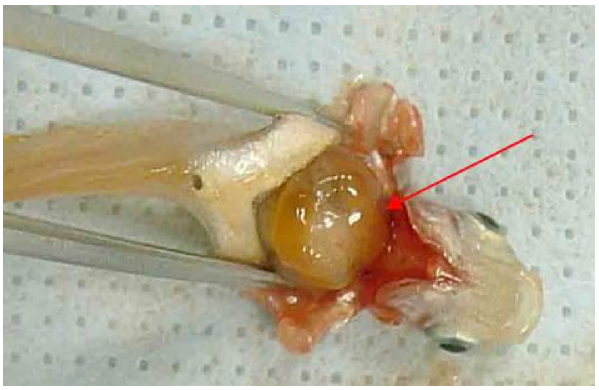
▼M7

Slika 3

Trebušne stene se razširijo s prijemalkami, da se izpostavijo jetra in drugi notranji organi.

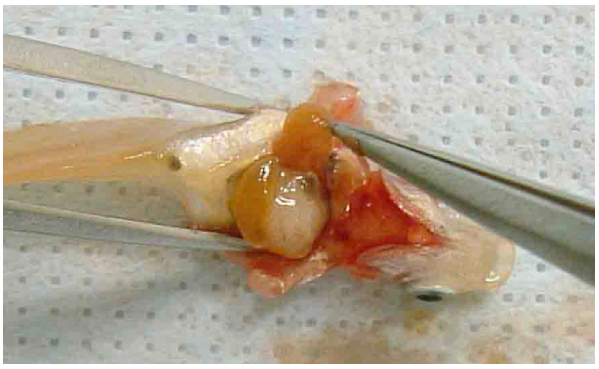
(Namesto tega se lahko trebušne stene pripnejo s strani.)

Jetra so označena s puščico.



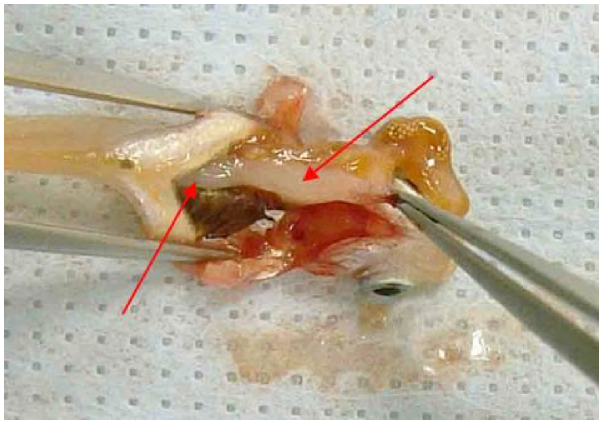
Slika 4

Jetra se secirajo in odstranijo s prijemalkami.



Slika 5

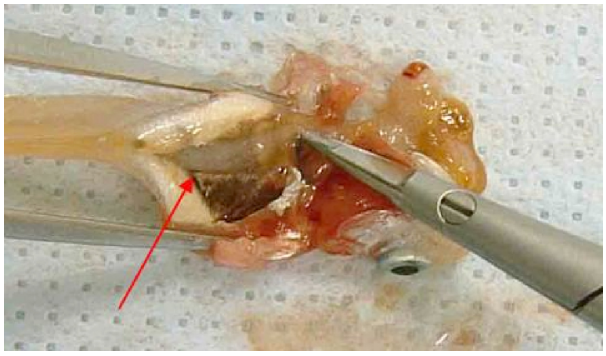
Črevesje se s prijemalkami nežno odmakne.



▼M7

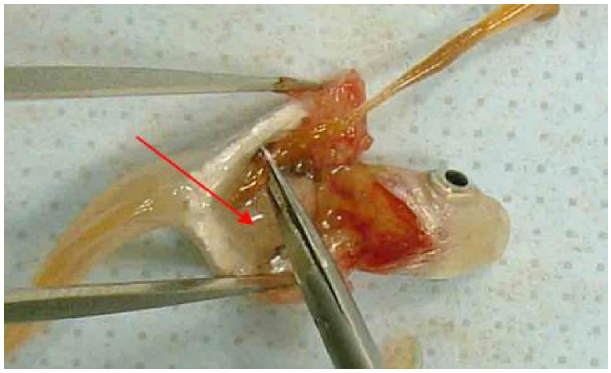
Slika 6

Oba konca črevesja in vse pritrditve mezenterija se odrežejo s škarjami.



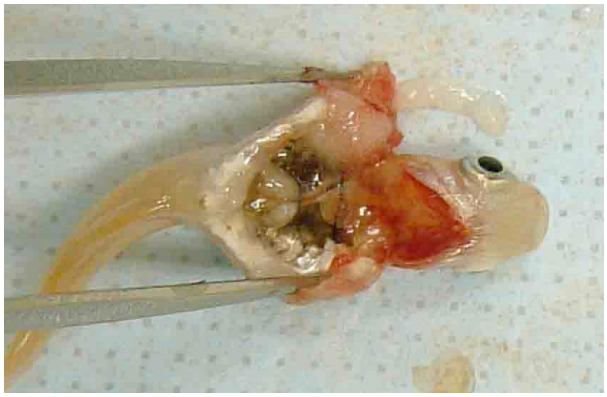
Slika 7 (samica)

Postopek za samico je enak.



Slika 8

Končan postopek.



▼M7

Postopek 2B: Japonska medaka (*Oryzias latipes*), predhodno tretiranje jeter za analizo vitelogenina

Iz kompleta za metodo ELISA se vzame steklenica homogenizacijskega pufra in ohladi z zdrobljenim ledom (temperatura raztopine: ≤ 4 °C). Če se uporabi homogenizacijski pufer iz sistema EnBio ELISA, se raztopina odtaja pri sobni temperaturi, nato pa se steklenica ohladi z zdrobljenim ledom.

Količina homogenizacijskega pufra za jetra se izračuna na podlagi njihove teže (doda se 50 µl homogenizacijskega pufra na miligram teže jeter). Če jetra tehtajo na primer 4,5 mg, je količina homogenizacijskega pufra za jetra 225 µl. Za vsa jetra se pripravi seznam s količinami homogenizacijskega pufra.

Priprava jeter za predhodno tretiranje

(1) Neposredno pred predhodnim tretiranjem se iz zamrzovalnika vzame 1,5-mililitrska mikroepruveta z jetri.

(2) Jetra samcev je treba predhodno tretirati pred jetri samic, da se prepreči kontaminacija z vitelogeninom. Poleg tega je treba preskusne skupine predhodno tretirati po naslednjem vrstnem redu: kontrola, kontrola s topilom (kadar je to ustrezno), najnižja koncentracija, srednja koncentracija, najvišja koncentracija in pozitivna kontrola.

(3) Število 1,5-mililitrskih mikroepruvet z vzorci jeter, vzetih iz zamrzovalnika ob danem času, ne sme presegati števila, ki se lahko centrifugira hkrati.

(4) Na zamrzovalnem stojalu se 1,5-mililitrske mikroepruvete z vzorci jeter razporedijo glede na številko vzorca (jeter ni treba odtajati).

Izvedba predhodnega tretiranja

1) Dodajanje homogenizacijskega pufra

Na seznamu se preveri količina homogenizacijskega pufra, ki ga je treba uporabiti za posamezen vzorec jeter, mikropipeta pa se nastavi (območje količine: 100–1 000 µl) na ustrezno količino. Na mikropipeto se namesti čista konica.

Homogenizacijski pufer se vzame iz steklenice za reagent in doda v 1,5-mililitrsko mikroepruveto z jetri.

Homogenizacijski pufer se doda v vse 1,5-mililitrske mikroepruvete z jetri v skladu z zgoraj opisanim postopkom. Konice mikropipete ni treba zamenjati z novo. Če je konica kontaminirana ali bi lahko bila kontaminirana, jo je treba zamenjati.

2) Homogenizacija jeter

— Na homogenizator mikroepruvete se namesti novo pestilo.

— Pestilo se vstavi v 1,5-mililitrsko mikroepruveto. Homogenizator mikroepruvete se drži tako, da stisne jetra med površino pestila in notranjo steno 1,5-mililitrske mikroepruvete.

— Homogenizator mikroepruvete mora delovati od 10 do 20 sekund. Med delovanjem se 1,5-mililitrska mikroepruveta ohlaja z zdrobljenim ledom.

▼M7

— Pestilo se dvigne iz 1,5-mililitrske mikroepruvete in približno 10 sekund pusti počivati. Nato se izvede vizualni pregled stanja suspenzije.

— Če se v suspenziji opazijo deli jeter, se ponovita koraka (3) in (4), da se pripravi zadovoljiv homogenat jeter.

— Suspendirani homogenat jeter se do centrifugiranja hladi na zamrzovalnem stojalu.

— Za vsak homogenat se pestilo zamenja z novim.

— Vsa jetra se homogenizirajo s homogenizacijskim pufrom v skladu z zgoraj opisanim postopkom.

3) Centrifugiranje suspendiranega homogenata jeter

— Temperatura ohlajene komore za centrifugiranje se potrdi pri ≤ 5 °C.

— V ohlajeno centrifugo se vstavijo 1,5-mililitrske mikroepruvete s suspendiranim homogenatom jeter (po potrebi se prilagodi ravnotežje).

— Suspendirani homogenat jeter se 10 minut centrifugira pri 13 000 g in ≤ 5 °C. Če so supernatanti ustrezno ločeni, se lahko centrifugalna sila in čas centrifugiranja po potrebi prilagodita.

— Po centrifugiranju se preveri, ali so supernatanti ustrezno ločeni (vrhnja plast: lipid, srednja plast: supernatant, spodnja plast: jetrno tkivo). Če ločitev ni ustrezna, se suspenzija ponovno centrifugira v enakih pogojih.

— Vsi vzorci se odstranijo iz ohlajene centrifuge in na zamrzovalnem stojalu razvrstijo glede na številko vzorca. Paziti je treba, da se ločene plasti po centrifugiranju ne suspendirajo ponovno.

4) Odvzemanje supernatanta

— Štiri 0,5-mililitrske mikroepruvete za shranjevanje supernatanta se položijo na stojalo za epruvete.

— Z mikropipeto se odvzame 30 µl vsakega supernatanta (ločenega kot srednja plast) in prenese v eno 0,5-mililitrsko mikroepruveto. Paziti je treba, da se ne odvzame lipid z vrhnje plasti ali jetrno tkivo s spodnje plasti.

— Supernatant se odvzame in prenese v drugi dve 0,5-mililitrski mikroepruveti na enak način, kot je opisano zgoraj.

— Z mikropipeto se odvzame preostali supernatant (če je mogoče: ≥ 100 µl). Nato se supernatant prenese v preostalo 0,5-mililitrsko mikroepruveto. Paziti je treba, da se ne odvzame lipid z vrhnje plasti ali jetrno tkivo s spodnje plasti.

— Pokrov 0,5-mililitrske mikroepruvete se zapre in na nalepko zapiše količina supernatanta. Takoj zatem se mikroepruvete ohladijo na zamrzovalnem stojalu.

— Za vsak supernatant se konica mikropipete zamenja z novo. Če se na konico prime veliko lipida, se takoj zamenja z novo, da se prepreči kontaminacija ekstrakta jeter z maščobo.

▼M7

— Ves centrifugirani supernatant se prenese v štiri 0,5-mililitrske mikroepruvete v skladu z zgoraj opisanim postopkom.

— Ko se supernatant prenese v 0,5-mililitrske mikroepruvete, se te postavijo na stojalo za epruvete z identifikacijskimi nalepkami in takoj nato zamrznejo v zamrzovalniku. Če se koncentracije VTG merijo takoj po predhodnem tretiranju, se ena 0,5-mililitrska mikroepruveta (ki vsebuje 30 µl supernatanta) ohrani hladna na stojalu za epruvete in prenese na delovno postajo, kjer se izvaja ELISA. V takem primeru se preostale mikroepruvete postavijo na rešetke za epruvete in zamrznejo v zamrzovalniku.

— Po odvzemu supernatanta se ostanki primerno zavržejo.

Shranjevanje vzorcev

Dokler se 0,5-mililitrske mikroepruvete s supernatantom homogenata jeter ne uporabijo za ELISA, se shranijo pri ≤ –70 °C.

Postopek 3A: Cebrica, odvzem krvi iz repne vene/arterije

Takoj po anesteziji se repno steblo prečno prereže in odvzame kri iz repne arterije/vene s heparinizirano mikrohematokritsko kapilarno cevko. Količine krvi so v območju 5–15 mikrolitrov in so odvisne od velikosti ribe. V mikrokapilarno cevko se doda enaka količina pufra aprotinina (6 mikrogramov/ml v PBS), plazma pa se od krvi loči s centrifugiranjem (5 minut pri 600 *g*). Plazma se zbere v preskusnih epruvetah in shrani pri –20 °C, dokler se ne analizira za VTG ali druge želene beljakovine.

Postopek 3B: Cebrica, odvzem krvi s punkcijo srca

Da se preprečita koagulacija krvi in razgradnja beljakovin, se vzorci odvzamejo v fosfatnem pufru s soljo (PBS), ki vsebuje heparin (1 000 enot/ml) in aprotinin, ki zavira proteazo (2 TIU/ml). Za sestavine pufra se priporočajo heparin, amonijeva sol in liofilizirani aprotinin. Za vzorčenje krvi se priporoča brizga (1 ml) s pritrjeno tanko iglo (npr. Braun Omnikan-F). Brizga mora biti predhodno napolnjena s pufrom (približno 100 mikrolitrov), da se iz vseh rib v celoti eluirajo majhne količine krvi. Vzorci krvi se odvzamejo s punkcijo srca. Najprej je treba ribe anestezirati z MS-222 (100 mg/l). Ustrezna stopnja anestezije uporabniku omogoča, da razloči srčni utrip cebrice. Med punkcijo srca naj bo bat brizge pod rahlo napetostjo. Odvzeta količina krvi je v območju 20–40 mikrolitrov. Po srčni punkciji je treba zmes krvi in pufra prenesti v preskusno epruveto. Plazma se od krvi loči s centrifugiranjem (20 minut, 5 000 *g*) in jo je treba shraniti pri –80 °C, dokler se ne potrebuje za analizo.

Postopek 3C SOP: cebrica, homogenizacija glave in repa

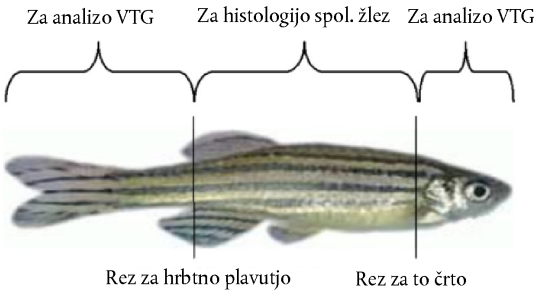
1. Ribe se anestezirajo in evtanazirajo v skladu z opisom preskusa.

2. Glava in rep ribe se odrežeta v skladu s sliko 1.

Opozorilo: *med ravnanji s posameznimi ribami je treba vse instrumente za seciranje in rezalno desko sprati in ustrezno očistiti (*npr. *s 96-odstotnim etanolom), da se prepreči kontaminacija neinduciranih samcev z vitelogeninom zaradi samic ali induciranih samcev.*

▼**M7**

Slika 1



3. Teža zbranih glav in repov posameznih rib se izmeri na miligram natančno.

4. Po tehtanju se deli vnesejo v ustrezne epruvete (npr. 1,5-mililitrske Eppendorfove epruvete) in zamrznejo pri –80 °C do homogenizacije oziroma dokler se ne homogenizirajo neposredno na ledu z dvema plastičnima pestiloma. (Druge metode se lahko uporabijo, če se izvajajo na ledu in zagotovijo homogeno maso.) Opozorilo: *epruvete je treba ustrezno oštevilčiti, da se lahko glava in rep ribe povežeta z ustreznim delom telesa, uporabljenim za histologijo spolnih žlez.*

5. Ko dobimo homogeno maso, se ji doda 4-kratna teža tkiva ledeno mrzlega **homogenizacijskega pufra** ([1]). Delo s pestiloma je treba nadaljevati, dokler zmes ni homogena. Opozorilo: *za vsako ribo se uporabita novi pestili.*

6. Vzorci se postavijo na led do začetka centrifugiranja pri **4 °C** in 50 000 *g* za 30 minut.

7. S pipeto se supernatant odmeri na dele po 20 µl v **vsaj dve** epruveti, tako da se konica pipete potopi pod plast maščobe na površini in supernatant previdno izsesa brez delcev maščobe ali peletov.

8. Epruvete se do uporabe hranijo pri – 80 °C.

([1]) Homogenizacijski pufer:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-odstotna zmes zaviralca proteaze (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl zmesi zaviralca proteaze.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), npr. Bie & Berntsen, Danska.
— Zmes zaviralca proteaze: Sigma (za tkivo sesalcev), številka izdelka P 8340.
OPOMBA: homogenizacijski pufer je treba uporabiti na dan priprave. Med uporabo ga je treba postaviti na led.

▼M7

Dodatek 7

OBOGATENI VZORCI VITELOGENINA IN MEDPRESKUSNI REFERENČNI STANDARD

Vsak dan izvedbe preskusov VTG se analizira obogateni vzorec, pripravljen z medpreskusnim referenčnim standardom. VTG, uporabljen za pripravo medpreskusnega referenčnega standarda, je iz serije, ki se razlikuje od serije, uporabljene za pripravo kalibracijskih standardov za preskus, ki se izvaja.

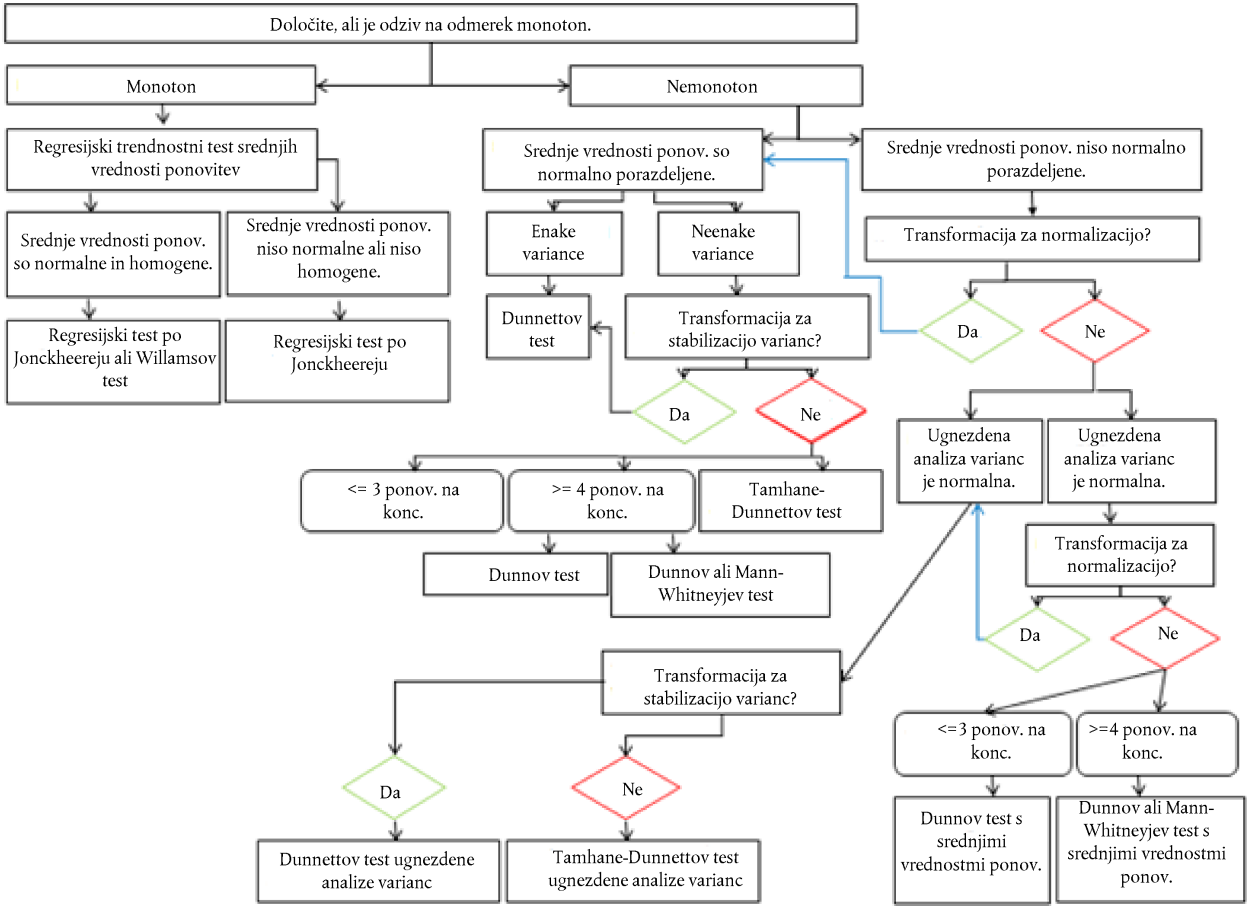
Obogateni vzorec se pripravi z dodajanjem znane količine medpreskusnega standarda vzorcu plazme kontrolnih samcev. Vzorec se obogati, da se doseže koncentracija VTG, ki je med 10- in 100-krat večja od pričakovane koncentracije vitelogenina pri kontrolnih ribjih samcih. Vzorec plazme kontrolnih samcev, ki se obogati, lahko izvira iz ene ribe ali pa je sestavljen iz več rib.

Podvzorec neobogatene plazme kontrolnih samcev se analizira v vsaj dveh podvojenih jamicah. Tudi obogateni vzorec se analizira v vsaj dveh podvojenih jamicah. Srednja količina vitelogenina v dveh neobogatenih vzorcih plazme kontrolnih samcev se prišteje izračunani količini VTG, dodanega obogatenim vzorcem, da se določi pričakovana koncentracija. Razmerje med pričakovano koncentracijo in izmerjeno koncentracijo se sporoči skupaj z rezultati posameznih nizov preskusov, izvedenih na isti dan.

▼M7

Dodatek 8

DIAGRAM POTEKA ZA IZBIRO STATISTIČNE ANALIZE



02008R0440 — SL — 16.10.2019 — 008.001 — 2495

▼M7

C.49 **Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka**

UVOD

1. Ta preskusna metoda (TM) je enakovredna Smernici za preskušanje OECD (TG) 236 (2013). Opisuje preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka pri cebrici (*Danio rerio*). Preskus je zasnovan tako, da se ugotovi akutna toksičnost kemikalij na embrionalnih fazah rib. Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka temelji na študijah in dejavnostih validacije, opravljenih na cebrici (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). Preskus akutne toksičnosti se uspešno uporablja pri številnih kemikalijah z različnimi načini delovanja, topnostjo, hlapnostjo in hidrofobnostjo (njihov pregled je na voljo v virih 15 in 16).

2. Pojmi, uporabljeni pri tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

3. Pravkar oplojene ikre cebric se za 96 ur izpostavijo preskusni kemikaliji. Vsakih 24 ur se kot indikatorji smrtnosti (6) zabeležijo do štiri opažanja na višjem nivoju biološke organizacije, in sicer (i) koagulacija oplojenih iker, (ii) odsotnost oblikovanja somitov, (iii) odsotnost ločenosti repa od vrečice rumenjaka in (iv) odsotnost srčnega utripa. Na koncu obdobja izpostavljenosti se akutna toksičnost določi na podlagi pozitivnega rezultata pri katerem koli od štirih opažanj na višjem nivoju biološke organizacije in izračuna se LC_{50}.

ZAČETNI PREUDARKI

4. Med uporabne informacije o specifičnih lastnostih snovi spadajo strukturna formula, molekulska masa, čistost, obstojnost v vodi in na svetlobi, pK_a in K_{ow}, topnost v vodi, parni tlak in rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (TM C.4 (17) ali TM C.29 (18)). Topnost in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so verjetne izgube zaradi izhlapevanja preskusne kemikalije. Na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo snovi v testnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo zaznavnosti.

5. Če se preskusna metoda uporablja za preskušanje zmesi, mora biti njena sestava v čim večji meri opredeljena s kemijsko identiteto sestavin, kvantitativnim pojavljanjem in specifičnimi lastnostmi snovi (glej odstavek 4). Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.

6. Obstajajo dokazi, da imajo zarodki cebric zmožnost biotransformacije za snovi, ki se lahko aktivirajo s presnovo (19) (20) (21) (22). Vendar presnovna zmogljivost zarodka ribe ni vedno podobna presnovni zmogljivosti mladic ali odraslih rib. Pri preskusu akutne toksičnosti na primer ni bil odkrit protoksični alil alkohol (9). Če torej obstajajo kakršni koli znaki, da so lahko metaboliti ali drugi pomembni produkti pretvorbe bolj strupeni kot izhodiščna spojina, se priporoča tudi, da se preskus izvede s temi metaboliti/produkti pretvorbe in da se tudi ti rezultati uporabijo pri ugotavljanju toksičnosti preskusne kemikalije ali pa da se opravi še en preskus, ki v večji meri upošteva presnovo.

7. Pri snoveh z molekulsko maso ≥ 3 kDa in zelo veliko molekulsko strukturo ter snoveh, ki povzročajo poznejšo izvalitev, kar bi lahko preprečilo ali zmanjšalo izpostavljenost po izvalitvi, se pričakuje, da zarodki ne bodo občutljivi zaradi omejene biološke dostopnosti snovi, zato bi lahko bili primernejši drugi preskusi toksičnosti.

▼M7

VELJAVNOST PRESKUSA

8. Za veljavnost rezultatov preskusa morajo biti izpolnjena naslednja merila:

a) Skupna stopnja oplojenosti vseh zbranih iker mora v vsaki seriji, ki se preskuša, znašati ≥ 70 %.

b) Temperatura vode v preskusnih komorah med preskusom nikoli ne sme biti višja ali nižja od 26 °C ± 1 °C.

c) Skupaj mora v negativni kontroli (z vodo za redčenje) ali kontroli s topilom, kadar je to primerno, do zaključka 96-urne izpostavljenosti preživeti ≥ 90 % zarodkov.

d) Izpostavljenost pozitivni kontroli (npr. 4,0 mg/l 3,4-dikloroanilina pri cebricah) mora ob zaključku 96-urne izpostavljenosti povzročiti najmanj 30-odstotno umrljivost.

e) Odstotek izvalitve v negativni kontroli (in kontroli s topilom, kadar je to primerno) mora ob zaključku 96-urne izpostavljenosti znašati ≥ 80 %.

f) Ob zaključku 96-urne izpostavljenosti morata koncentracija raztopljenega kisika v negativni kontroli in najvišja preskusna koncentracija znašati ≥ 80 % nasičenosti.

OPIS METODE

9. Pregled priporočenega vzdrževanja in preskusnih pogojev je na voljo v Dodatku 2.

Oprema

10. Potrebna je naslednja oprema:

a) akvariji iz kemijsko inertnih materialov (npr. stekleni) in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev (glej odstavek 14 „Vzdrževanje plemenskih rib“);

b) obrnjeni mikroskop in/ali binokularni mikroskop z zmogljivostjo vsaj 80-kratne povečave. Če temperature prostora, ki se uporablja za beleženje opažanj, ni mogoče nastaviti na 26 °C ± 1 °C, je treba zagotoviti križno mizico z uravnavanjem temperature ali druge metode za vzdrževanje temperature;

c) preskusne komore, npr. standardne plošče s 24 jamicami, globokimi približno 20 mm (glej odstavek 11 „Preskusne komore“);

d) npr. samolepilna folija za prekrivanje plošč s 24 jamicami;

e) inkubator ali klimatiziran prostor z nadzorovano temperaturo, ki omogoča vzdrževanje 26 °C ± 1 °C v jamicah (ali preskusnih komorah);

f) merilnik vrednosti pH;

g) oksimeter;

h) oprema za določanje trdote vode in prevodnosti;

i) lovilna posoda za ikre: pladnji iz stekla, nerjavnega rekla ali drugih inertnih materialov z žičnato mrežo (velikost rešetk 2 mm ± 0,5 mm) iz nerjavnega jekla ali drugega inertnega materiala, da se zaščitijo odložene ikre, in substrat za drstenje (npr. imitacije rastlin iz inertnih materialov) (TM C.48, Dodatek 4a (23));

j) pipete s širšimi odprtinami za zbiranje iker;

▼M7

k) steklene posode za pripravo različnih preskusnih koncentracij in vode za redčenje (čaše, merilne bučke, merilni valji in polnilne pipete) ali za zbiranje iker cebrice (npr. čaše, kristalizirke);

l) če se za izvajanje preskusa uporabijo nadomestni sistemi izpostavljenosti, kot je na primer pretočni preskus (24) ali pasivno odmerjanje (25), je treba zagotoviti ustrezne prostore in opremo.

Preskusne komore

11. Uporabiti je treba steklene preskusne komore ali preskusne komore iz polistirena (npr. plošče s 24 jamicami, v vsako jamico pa se lahko natoči 2,5–5 ml tekočine). Če obstaja sum adsorpcije v polistiren (npr. pri nepolarnih, planarnih snoveh z visokim K_{ow}), je treba uporabiti inertne materiale (steklo), da se zmanjšajo izgube zaradi adsorpcije (26). Preskusne komore je treba naključno postaviti v inkubator.

Voda in preskusni pogoji

12. Priporočljivo je razredčiti vodo za vzdrževanje, da se dosežejo ravni trdote, ki so običajne za številne površinske vode. Vodo za redčenje je treba pripraviti iz modelne razredčevalne vode (27). Nastala stopnja trdote mora znašati 100–300 mg/l $CaCO_3$, da se prepreči presežno obarjanje kalcijevega karbonata. Uporabi se lahko tudi druga površinska voda z značilnostmi vode iz vodnjaka ali voda iz vodnjaka. Modelna razredčevalna voda se lahko prilagodi vodi za vzdrževanje nizke trdote tako, da se z deionizirano vodo razredči do razmerja 1: 5 na najmanjšo trdoto 30–35 mg/l $CaCO_3$. Pred dodajanjem preskusne kemikalije se voda prezrači do nasičenosti s kisikom. Med preskusom je treba v jamicah ohranjati temperaturo 26 ± 1°C. Med preskusom mora biti vrednost pH med 6,5 in 8,5, znotraj tega območja pa se ne sme razlikovati za več kot 1,5 enote. Če se pričakuje, da vrednost pH ne bo ostala v tem območju, jo je treba prilagoditi pred začetkom preskusa. Prilagoditev vrednosti pH je treba opraviti tako, da se koncentracija osnovne raztopine ne spremeni bistveno in da se ne povzroči kemijska reakcija ali obarjanje preskusne kemikalije. Priporoča se, da se za popravljanje vrednosti pH v raztopinah, ki vsebujejo preskusno kemikalijo, uporabita klorovodik (HCl) in natrijev hidroksid (NaOH).

Testne raztopine

13. Testne raztopine izbranih koncentracij se lahko pripravijo na primer z razredčitvijo osnovne raztopine. Najbolje je, če se osnovne raztopine pripravijo preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z mehanskimi sredstvi (npr. z mešanjem in/ali ultrazvočno kopeljo). Če se preskusna kemikalija v vodi težko raztopi, je treba upoštevati postopke, opisane v Smernicah OECD št. 23 za ravnanje z zahtevnimi snovmi in zmesmi (28). Izogibati se je treba uporabi topil, vendar je v nekaterih primerih morda potrebna, da se pripravi primerno koncentrirana osnovna raztopina. Če se pri pripravi osnovne raztopine kot pomoč uporabi topilo, njegova končna koncentracija ne sme biti večja od 100 µl/l in mora biti enaka v vseh preskusnih posodah. Če se uporabi topilo, je potrebna dodatna kontrola s topilom.

Vzdrževanje plemenskih rib

14. Za proizvajanje iker se uporabi matična jata neizpostavljenih divjih cebric z dobro dokumentirano stopnjo oplojenosti iker. Ribe ne smejo imeti makroskopsko opaznih simptomov okužbe ali bolezni, dva meseca pred drstenjem pa se ne smejo (akutno ali preventivno) zdraviti z zdravilom. Matične ribe se hranijo v akvarijih s priporočeno prostornino 1 l vode na ribo in določenim 12–16-urnim obdobjem osvetljenosti (29) (30) (31) (32) (33). Prilagoditi je

▼M7

treba optimalne stopnje filtracije in ne smejo se uporabljati prevelike stopnje filtracije, ki zelo vznemirjajo vodo. Za pogoje hranjenja glej Dodatek 2. Izogibati se je treba prekomernemu hranjenju in redno spremljati kakovost vode in čistočo akvarijev, po potrebi pa jih je treba znova vrniti v začetno stanje.

Preverjanje usposobljenosti

15. Kot referenčno kemikalijo je treba v celotnem območju odziva na koncentracijo preskusiti 3,4-dikloroanilin (uporablja se v validacijskih študijah (1) (2)), da se preveri občutljivost uporabljene vrste rib, in sicer po možnosti dvakrat na leto. Laboratoriji, ki ta preskus izvajajo prvič, morajo uporabiti referenčno kemikalijo. Laboratoriji lahko uporabijo to kemikalijo, da dokažejo, da so tehnično usposobljeni za izvajanje tega preskusa, preden podatke predložijo v regulativne namene.

Proizvajanje iker

16. Ikre cebric lahko proizvedejo drsteče jate (v posameznih akvarijih za drstenje) ali pa se proizvedejo z množičnim drstenjem (v akvarijih za vzdrževanje). V primeru drstečih jat se samci in samice (npr. v razmerju 2: 1) iz matične jate dajo v akvarije za drstenje nekaj ur pred stemnitvijo na dan pred preskusom. Ker se lahko zgodi, da se drsteče jate cebric občasno ne drstijo, se priporoča istočasna uporaba vsaj treh akvarijev za drstenje. Da se izogne genetskim vplivom, se ikre odvzamejo pri vsaj treh matičnih jatah, premešajo in naključno izberejo.

17. Za odvzem iker se v akvarije za drstenje ali akvarije za vzdrževanje pred stemnitvijo na dan pred preskusom ali pred svitom na dan preskusa namestijo lovilne posode za ikre. Da se odraslim cebricam prepreči plenjenje iker, se lovilne posode za ikre prekrijejo z inertno žičnato mrežo z ustrezno velikostjo rešetk (približno 2 mm ± 0,5 mm). Po potrebi se lahko na mrežo pritrdijo umetne rastline iz inertnega materiala (npr. iz plastike ali stekla) za spodbujanje drstenja (3) (4) (5) (23) (35). Uporabiti je treba plastične materiale, izpostavljene vremenskim vplivom, ki se ne lužijo (npr. ftalate). Parjenje, drstenje in oploditev se začnejo v 30 minutah po svitu in lovilne posode za ikre z odvzetimi ikrami se lahko previdno odstranijo. Priporoča se, da se ikre po odstranitvi iz lovilnih posod za ikre sperejo z modelno razredčevalno vodo.

Diferenciacija iker

18. Pri 26 °C oplojene ikre po približno 15 minutah prestanejo prvo brazdanje in z zaporednimi sinhronimi brazdanji se oblikuje 4, 8, 16 in 32 celičnih blastomer (glej Dodatek 3) (35). V teh fazah se lahko oplojene ikre zlahka opredelijo, saj se razvije blastula.

POSTOPEK

Pogoji izpostavljenosti

19. Preskusni kemikaliji je izpostavljenih dvajset zarodkov na posamezno koncentracijo (en zarodek na jamico). Izpostavljenost mora biti taka, da se med preskusom ohrani ±20 % nominalne koncentracije kemikalije. Če to v statičnem sistemu ni mogoče, je treba uporabiti obvladljiv polstatičen interval zamenjave (npr. zamenjava vsakih 24 ur). V teh primerih je treba koncentracije izpostavljenosti preveriti vsaj pri najvišji in najnižji preskusni koncentraciji na začetku in na koncu vsakega intervala izpostavljenosti (glej odstavek 36). Če koncentracije izpostavljenosti v višini ±20 % nominalnih koncentracij ni mogoče ohraniti, je treba vse koncentracije izmeriti na začetku in na koncu vsakega intervala izpostavljenosti (glej odstavek 36). Ob zamenjavi vode je treba zagotoviti, da so zarodki prekriti z majhno

▼M7

količino starih testnih raztopin, da se ne izsušijo. Načrt preskusa se lahko prilagodi, da se izpolnijo zahteve preskušanja specifičnih snovi (npr. pretočnega preskušanja (24) ali sistemov pasivnega odmerjanja (25) za lahko razgradljive ali zelo adsorptivne snovi (29) ali drugih preskušanj za hlapne snovi (36) (37)). V vsakem primeru je treba paziti, da so zarodki pod čim manjšim stresom. Preskusne komore je treba pred začetkom preskusa vsaj 24 ur kondicionirati s testnimi raztopinami. Preskusni pogoji so povzeti v Dodatku 2.

Preskusne koncentracije

20. Običajno je potrebnih pet koncentracij preskusne kemikalije, ki se med seboj razlikujejo za konstantni faktor, ki ni večji od 2,2, da se izpolnijo statistične zahteve. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Najbolje je, če najvišja preskusna koncentracija povzroči 100 % smrtnost, najnižja preskusna koncentracija pa ne bi smela imeti opaznega učinka, kot je opredeljeno v odstavku 28. Preskus za določanje območja delovanja pred končnim preskusom omogoča, da se izbere ustrezno območje koncentracije. Ta preskus se običajno izvede z desetimi zarodki na posamezno koncentracijo. Navodila v nadaljevanju se nanašajo na izvajanje preskusa na ploščah s 24 jamicami. Če se uporabijo drugačne preskusne komore (npr. majhne petrijevke) ali če se preskuša več koncentracij, je treba navodila ustrezno prilagoditi.

21. Podrobni podatki in slikovna navodila za porazdelitev koncentracij po ploščah s 24 jamicami so na voljo v odstavku 27 in na sliki 1 v Dodatku 4.

Kontrole

22. Kontrole z vodo za redčenje so potrebne kot negativne kontrole in kot notranje kontrole plošč. Če se pri notranji kontroli plošč opazi več kot en mrtev zarodek, se plošča zavrne, s čimer se zmanjša število koncentracij, uporabljenih za izračun LC_{50}. Če se zavrne celotna plošča, sta ocenjevanje in zaznavanje opaženih učinkov lahko težja, zlasti če je zavrnjena plošča plošča s kontrolo s topilom ali plošča, v kateri so prizadeti tudi tretirani zarodki. V prvem primeru je treba preskus ponoviti. V drugem primeru lahko izguba celotne tretirane skupine zaradi notranje umrljivosti v kontroli omeji zmožnost ocenjevanja učinkov in določanja vrednosti LC_{50}.

23. Pozitivna kontrola pri nespremenljivi koncentraciji 4 mg/l 3,4-dikloroanilina se opravi pri vsaki seriji iker, ki se uporabi za preskušanje.

24. Če se uporabi topilo, se mu izpostavi dodatna skupina 20 zarodkov na ločeni plošči s 24 jamicami kot kontrola s topilom. Preskus se šteje za sprejemljivega, če se dokaže, da topilo nima bistvenih učinkov na čas izvalitve in preživetje ter drugih škodljivih učinkov na zarodke (primerjaj odstavek 8c).

Začetek izpostavljenosti in trajanje preskusa

25. Preskus se začne čim prej po oploditvi iker in konča po 96 urah izpostavljenosti. Pred začetkom brazdanja blastodiska ali najpozneje do faze šestnajstih celic je treba zarodke potopiti v testne raztopine. Da se izpostavljenost začne s čim manjšo zamudo, se naključno izbere vsaj dvakrat večje število iker na posamezno tretirano skupino, ki se prenesejo v zadevne koncentracije in kontrole (npr. v 100 ml kristalizirkah, pri čemer morajo biti ikre v celoti prekrite) najpozneje 90 minut po oploditvi.

26. Oplojene ikre, sposobne preživetja, je treba ločiti od neoplojenih iker in prenesti na plošče s 24 jamicami, ki so se predhodno 24 ur kondicionirale

▼M7

in ki se v 180 minutah po oploditvi ponovno napolnijo z 2 ml/jamico sveže pripravljenih testnih raztopin. S stereomikroskopom (po možnosti z vsaj 30-kratno povečavo) se izberejo oplojene ikre, pri katerih poteka brazdanje in pri katerih med brazdanjem niso bile odkrite očitne nepravilnosti (npr. nesimetričnost, oblikovanje mešičkov) ali poškodbe horija. Za zbiranje in ločevanje iker glej sliki 1 in 3 v Dodatku 3 ter sliko 2 v Dodatku 4.

Porazdelitev iker po ploščah s 24 jamicami

27. Ikre se porazdelijo po ploščah z jamicami v skladu z naslednjimi števili (glej tudi sliko 1 v Dodatku 4):

— 20 iker na eni plošči za vsako preskusno koncentracijo,

— 20 iker kot kontrola s topilom na eni plošči (po potrebi),

— 20 iker kot pozitivna kontrola na eni plošči,

— 4 ikre v vodi za redčenje kot notranja kontrola plošč na vsaki zgornji plošči,

— 24 iker v vodi za redčenje kot negativna kontrola na eni plošči.

Opažanja

28. Opažanja na višjem nivoju biološke organizacije, ki se opravijo pri vsakem preskušanem zarodku, vključujejo koagulacijo zarodkov, odsotnost oblikovanja somitov, odsotnost ločenosti repa in odsotnost srčnega utripa (preglednica 1). Ta opažanja se uporabljajo za ugotavljanje smrtnosti. Morebiten pozitiven rezultat pri enem od navedenih opažanj pomeni, da je zarodek cebrice mrtev. Poleg tega se po 48 urah vsak dan zabeleži izvalitev v tretiranih in kontrolnih skupinah. Opažanja se zabeležijo vsakih 24 ur do konca preskusa.

Preglednica 1

Opažanja na višjem nivoju biološke organizacije v zvezi z akutno toksičnostjo pri zarodkih cebric 24–96 ur po oploditvi.

	Čas izpostavljenosti			
	24 ur	48 ur	72 ur	96 ur
Koagulirani zarodki	+	+	+	+
Odsotnost oblikovanja somitov	+	+	+	+
Odsotnost ločenosti repa	+	+	+	+
Odsotnost srčnega utripa		+	+	+

29. *Koagulacija zarodka:* koagulirani zarodki so mlečno beli in temni pod mikroskopom (glej sliko 1 v Dodatku 5). Število koaguliranih zarodkov se določi po 24, 48, 72 in 96 urah.

30. *Odsotnost oblikovanja somitov:* po 24 urah se pri 26 °C ± 1 °C v zarodku cebric, ki se normalno razvija, oblikuje približno 20 somitov (glej sliko 2 v Dodatku 5). Pri normalno razvitem zarodku se opazijo spontani gibi (stransko krčenje). Spontani gibi pomenijo oblikovanje somitov. Odsotnost somitov se zabeleži po 24, 48, 72 in 96 urah. Če se somiti po 24 urah ne oblikujejo, je to lahko posledica splošnega zaostajanja pri razvoju. Najpozneje po 48 urah bi se morali oblikovati somiti. V nasprotnem primeru se zarodki štejejo za mrtve.

31. *Odsotnost ločenosti repa:* v zarodku cebric, ki se normalno razvija, se ločitev repa (glej sliko 3 v Dodatku 5) od rumenjaka opazi po podaljšanju

▼M7

zadnjega dela telesa zarodka. Odsotnost ločenosti repa se zabeleži po 24, 48, 72 in 96 urah.

32. *Odsotnost srčnega utripa:* v zarodku cebric, ki se normalno razvija, je pri 26 °C ± 1 °C srčni utrip viden po 48 urah (glej sliko 4 v Dodatku 5). Pri beleženju te končne točke je potrebna posebna previdnost, saj se nepravilen (neenakomeren) srčni utrip *ne sme* zabeležiti kot smrtonosen. Poleg tega se vidni srčni utrip brez obtoka v abdominalni aorti šteje za nesmrtonosnega. Za beleženje te končne točke je treba zarodke, pri katerih ni viden srčni utrip, vsaj eno minuto opazovati pod najmanj 80-kratno povečavo. Odsotnost srčnega utripa se zabeleži po 48, 72 in 96 urah.

33. Odstotke izvalitve vseh tretiranih in kontrolnih skupin je treba začeti beležiti in poročati po 48 urah. Čeprav izvalitev ni končna točka, ki se uporablja za izračun LC_{50}, zagotavlja izpostavljenost zarodka brez morebitne pregradne funkcije horija in lahko zato pomaga pri razlagi podatkov.

34. Primeri normalnega (35) in neobičajnega razvoja zarodkov cebric so podrobno opisani v dodatkih 3 in 5.

Analitske meritve

35. Na začetku in na koncu preskusa se izmerijo vrednost pH, skupna trdota in prevodnost v kontrolah ter v največji koncentraciji preskusne kemikalije. V polstatičnih sistemih zamenjave je treba vrednost pH izmeriti pred zamenjavo vode in po njej. Koncentracija raztopljenega kisika se v negativnih kontrolah in najvišji preskusni koncentraciji z zarodki, sposobnimi preživetja, izmeri na koncu preskusa, pri čemer mora biti skladna z merili za veljavnost preskusa (glej odstavek 8f). Če obstaja dvom, da se temperatura med ploščami s 24 jamicami razlikuje, se temperatura izmeri v treh naključno izbranih posodah. Najbolje je, če se temperatura med preskusom beleži stalno oziroma vsaj dnevno.

36. Pri statičnemu sistemu je treba koncentracijo preskusne kemikalije izmeriti vsaj v najvišji in najnižji preskusni koncentraciji na začetku in na koncu preskusa, vendar je najbolje, če se izmeri pri vseh tretiranjih. Pri polstatičnih preskusih (zamenjavah), pri katerih bi morala koncentracija preskusne kemikalije ostati v območju ± 20 % nominalnih vrednosti, se priporoča, da se analizirata vsaj najvišja in najnižja preskusna koncentracija, ko sta sveže pripravljeni in takoj pred zamenjavo. Pri preskusih, pri katerih se pričakuje, da koncentracija preskusne kemikalije ne bo ostala v območju ± 20 % nominalne vrednosti, je treba analizirati vse preskusne koncentracije, ko so sveže pripravljene in takoj pred zamenjavo vode. V primeru nezadostne količine za analizo je lahko koristna združitev testnih raztopin ali uporaba nadomestnih komor iz enakega materiala in z enakim razmerjem med prostornino in površino kot pri ploščah s 24 jamicami. Zelo se priporoča, naj rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije, je treba učinek koncentracij izraziti glede na geometrijsko sredino izmerjenih koncentracij (glej poglavje 5 v Smernicah OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (28)).

MEJNI PRESKUS

37. S postopki, opisanimi v tej preskusni metodi, se lahko izvede mejni preskus s 100 mg/l preskusne kemikalije ali pri meji topnosti v preskusnem gojišču (pri čemer se uporabi nižja od obeh vrednosti), da se dokaže, da je vrednost LC_{50} višja od te koncentracije. Mejni preskus je treba izvesti pri 20 zarodkih

▼M7

v tretiranju, pozitivni kontroli in po potrebi kontroli s topilom ter 24 zarodkih v negativni kontroli. Če je odstotek smrtnosti v preskušani koncentraciji za 10 % večji od odstotka umrljivosti v negativni kontroli (ali kontroli s topilom), je treba izvesti celotno študijo. Vse opažene učinke je treba zabeležiti. Če je umrljivost za 10 % večja v negativni kontroli (ali kontroli s topilom), je preskus neveljaven in ga je treba ponoviti.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

38. Pri tem preskusu se za statistično analizo posamezne jamice štejejo za neodvisne ponovljene vzorce. Odstotki zarodkov, pri katerih je pozitivno vsaj eno opažanje na višjem nivoju biološke organizacije pri 48 urah in/ali 96 urah, se lahko prikažejo v odvisnosti od preskusnih koncentracij. Za izračun naklonov krivulje, vrednosti LC_{50} in mej zaupanja (95 %) je treba uporabiti ustrezne statistične metode (38) in upoštevati dokument OECD z naslovom „Sodobni pristopi pri statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo“ (39).

Poročilo o preskusu

39. V poročilu o preskusu je treba navesti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija:

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč. kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusni organizmi:

— znanstveno ime, sev, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

Preskusni pogoji:

— uporabljeni preskusni postopek (npr. polstatična zamenjava);

— obdobje osvetljenosti;

— načrt preskusa (npr. število preskusnih komor, vrste kontrol);

— lastnosti kakovosti vode pri vzdrževanju rib (npr. vrednost pH, trdota, temperatura, prevodnost, raztopljeni kisik);

— koncentracija raztopljenega kisika, vrednost pH, skupna trdota, temperatura in prevodnost testnih raztopin na začetku in po 96 urah;

— metoda priprave osnovnih raztopin in testnih raztopin ter pogostost zamenjave;

▼M7

— utemeljitev uporabe in izbire topila, če to ni voda;

— nominalne preskusne koncentracije in rezultat vseh analiz za določanje koncentracije preskusne kemikalije v preskusnih posodah; poročati je treba o izkoristku učinkovitosti metode in meji določljivosti (LOQ);

— dokazi, da so kontrole izpolnjevale merila za veljavnost v zvezi s skupnim preživetjem;

— stopnja oplojenosti iker;

— odstotek izvalitve v tretiranih in kontrolnih skupinah.

Rezultati:

— najvišja koncentracija, ki med preskusom ne povzroči umrljivosti;

— najnižja koncentracija, ki med preskusom povzroči 100-odstotno umrljivost;

— skupna umrljivost za vsako koncentracijo ob priporočenih časih opazovanja;

— vrednosti LC_{50} po 96 urah (in neobvezno po 48 urah) za umrljivost s 95-odstotnimi mejami zaupanja, če je to mogoče;

— graf s krivuljo koncentracija–umrljivost na koncu preskusa;

— umrljivost v kontrolah (v negativnih kontrolah, notranjih kontrolah plošč, pozitivni kontroli in morebitni uporabljeni kontroli s topilom);

— podatki o rezultatih vseh štirih opažanj na višjem nivoju biološke organizacije;

— pogostost in opis morfoloških in fizioloških anomalij, če obstajajo (glej primere na sliki 2 v Dodatku 5);

— incidenti med preskusom, ki lahko vplivajo na rezultate;

— statistična analiza in obdelava podatkov (probit analiza, model logistične regresije in geometrijska sredina za LC_{50});

— naklon in meje zaupanja regresije (transformirane) krivulje koncentracija–odziv.

Vsa odstopanja od preskusne metode in ustrezna pojasnila.

Razprava in razlaga rezultatov.

VIRI

(1) OECD (2011). Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Pariz.

(2) OECD (2012). Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Pariz.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. in Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish

▼M7

LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87–102.

(4) ISO (2007). Mednarodni standard. Kakovost vode – Določevanje akutne toksičnosti odpadnih voda na jajčeca cebric (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E). Mednarodna organizacija za standardizacijo.

(5) Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38–48.

(6) Schulte, C. in Nagel, R. (1994). Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12–19.

(7) Bachmann, J. (2002). Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Nemčija.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. in Nagel, R. (1995). Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087–2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F. J. M., Rico-Rico, A., Kramer, N. I., Hermens, J. L. M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690–9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. in Wosniok, W. (2006). Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97–102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. in Freundt, K. J. (1994). Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401–406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. in Freundt, K. J. (1993). Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878–882.

(13) Nguyen, L. T. in Janssen, C. R. (2001). Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566–571.

(14) Cheng, S. H., Wai, A. W. K., So, C. H. in Wu, R. S. S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024–3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. in Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768–1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196–209

(17) Poglavje C.4 te priloge: Dobra biološka razgradljivost.

(18) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biološka razgradljivost – CO_2 v zaprtih posodah.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25–36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T. H. (2012). Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133–141.

(21) Incardona, J. P, Linbo, T. L., Scholz, N. L. (2011). Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242–249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R. E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011). Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244–252.

(23) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib. Glej Dodatek 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H. G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E. R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009). Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436–1442.

(25) Brown, R. S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I. S., Villerius, L. A., Klamer, H. J. C., (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008). How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676–1682.

(27) ISO (1996). Mednarodni standardi. Kakovost vode – Ugotavljanje akutne smrtne toksičnosti snovi s sladkovodnimi ribami (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)). ISO 7346-3: Pretočna metoda. Dostopen na: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Pariz.

(29) Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121–173.

(30) Westerfield, M. (2007). The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, ZDA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005). Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf.

(32) Evropska komisija (2007). Priporočilo Komisije 2007/526/ES z dne 18. junija 2007 o smernicah za bivališča in oskrbo živali, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene (notificirano pod dokumentarno številko C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:SL:PDF]

(33) Evropska unija (2010). Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene. UL L 276, 20.10.2010, str. 33.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:SL:PDF

(34) Nagel, R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173–181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. in Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253–310.

(36) Poglavje C.2 te priloge: Preskus akutne imobilizacije vodnih bolh (*Daphnia sp.*)

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009). Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970–1978.

(38) ISO (2006). Mednarodni standard. Kakovost vode – Navodilo za statistično interpretacijo ekotoksikoloških podatkov. ISO TS 20281. Dostopen na: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006). Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariz.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 str.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Končna točka na višjem nivoju biološke organizacije: povzroča učinke na ravni populacije.

Blastula: celična tvorba okoli animalnega pola, ki prekriva določen del rumenjaka.

Kemikalija: snov ali zmes.

Epibolija: je velika proliferacija zlasti epidermalnih celih v fazi gastrulacije zarodka in njihovo gibanje od dorzalne proti ventralni strani, s katerim se entodermalne celične plasti internalizirajo pri procesu, podobnem invaginaciji, rumenjak pa se vključi v zarodek.

Pretočni preskus: preskus, pri katerem se testne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

Notranja kontrola plošč: notranja kontrola, ki jo sestavljajo štiri jamice, napolnjene z vodo za redčenje, na vsaki plošči s 24 jamicami, da se ugotovi, ali je proizvajalec ali raziskovalec med postopkom morda kontaminiral plošče in ali lahko katera koli plošča vpliva na rezultat preskusa (npr. zaradi temperaturnega gradienta).

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

Voda za vzdrževanje: voda, v kateri poteka oskrba odraslih rib.

Srednja smrtna koncentracija (LC_{50}): koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

Preskus polstatične zamenjave: preskus z redno zamenjavo testnih raztopin po določenih obdobjih (npr. vsakih 24 ur).

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

Somit: v razvijajočem se zarodku vretenčarja so somiti množice mezoderma, ki je razporejen prečno glede na živčno cev, in ki bodo sčasoma razvili usnjico (dermatom), skeletno mišico (miotom) in vretenca (sklerotom).

Statični preskus: preskus, pri katerem se testne raztopine med preskusom ne spremenijo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

▼M7

Dodatek 2

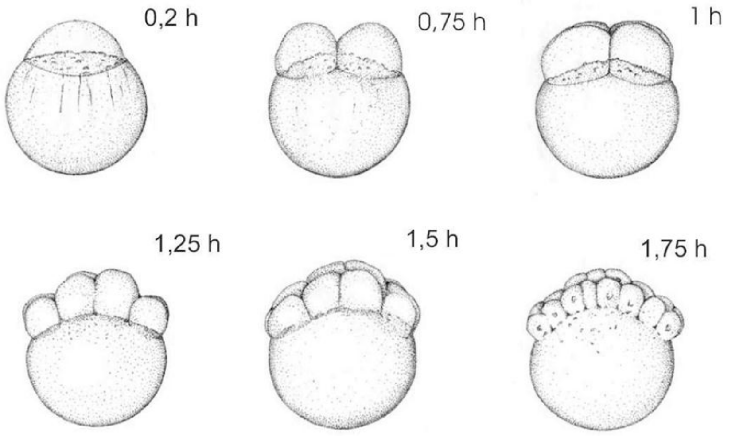
VZDRŽEVANJE, RAZMNOŽEVANJE IN OBIČAJNI POGOJI ZA PRESKUSE AKUTNE TOKSIČNOSTI ZARODKA CEBRICE

		Cebrica (*Danio rerio*)
Izvor živalske vrste		Indija, Mjanmar, Malaka, Sumatra
Spolni dimorfizem		Samice: izstopajoč trebuh, ko nosijo ikre. Samci: vitkejši, oranžni odtenek med modrimi vzdolžnimi črtami (opazen zlasti pri predrepni plavuti).
Način hranjenja		Suha hrana v kosmičih (največ 3 % teže ribe na dan) 3–5-krat na dan; dodatno navpliji morskih rakcev (vrste *Artemia*) in/ali majhne vodne bolhe ustrezne velikosti, pridobljene iz nekontaminiranega vira. S hranjenjem z živo hrano se obogati okolje, zato je treba cebrice hraniti z živo hrano, če je to le mogoče. Za zagotovitev optimalne kakovosti vode je treba čezmerno količino hrane in iztrebke odstraniti približno eno uro po hranjenju.
Približna teža odrasle ribe		Samice: 0,65 ± 0,13 g. Samci: 0,5 ± 0,1 g.
Vzdrževanje starševskih rib	Osvetlitev	Fluorescenčne sijalke (široki spekter), 10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 luksov ali 50–100 ft-c (ravni v laboratoriju); 12–16-urno obdobje osvetljenosti.
	Temperatura vode	26 °C ± 1 °C
	Kakovost vode	$O_2 \geq 80$ % nasičenosti, trdota: npr. ~30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ in NO_2^-: < 0,001 mg/l, preostali klor < 10 µg/l, skupni organski klor < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5.
	Dodatna merila kakovosti vode	Delci < 20 mg/l, skupni organski ogljik < 2 mg/l, celotni organofosforni pesticidi < 50 ng/l, celotni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili < 50 ng/l.
	Velikost akvarijev za vzdrževanje	Npr. 180 l, 1 riba/l.
	Čiščenje vode	Stalno (prečiščevanje z ogljem), druge možnosti pa so med drugim kombinacija z vzdrževanjem s polstatično zamenjavo ali pretočnim sistemom z neprekinjeno zamenjavo vode.
	Priporočeno razmerje samcev in samic za razmnoževanje	2: 1 (ali množično drstenje).
Akvariji za drstenje		Npr. akvariji prostornine 4 l z jekleno mrežo na dnu in umetno rastlino za spodbujanje drstenja, zunanji ogrevalni podstavki ali množično drstenje znotraj akvarijev za vzdrževanje.
Struktura in videz iker		Stabilen horij (tj. zelo prozoren, nelepljiv, premera 0,8–1,5 mm).
Hitrost drstenja		Ena odrasla samica odloži vsaj 50–80 iker na dan. Hitrost drstenja je lahko bistveno večja, kar je odvisno od vrste. Stopnja oplojenosti mora znašati ≥ 70 %. Pri ribah, ki se prvič drstijo, je lahko stopnja oplojenosti iker nižja pri prvih nekaj drstenjih.
Vrsta preskusa		Statični preskus, polstatična zamenjava, pretočni preskus, 26 °C ± 1 °C, preskusne komore, ki so se kondicionirale 24 ur (npr. plošče s 24 jamicami s 2,5–5 ml na jamico)

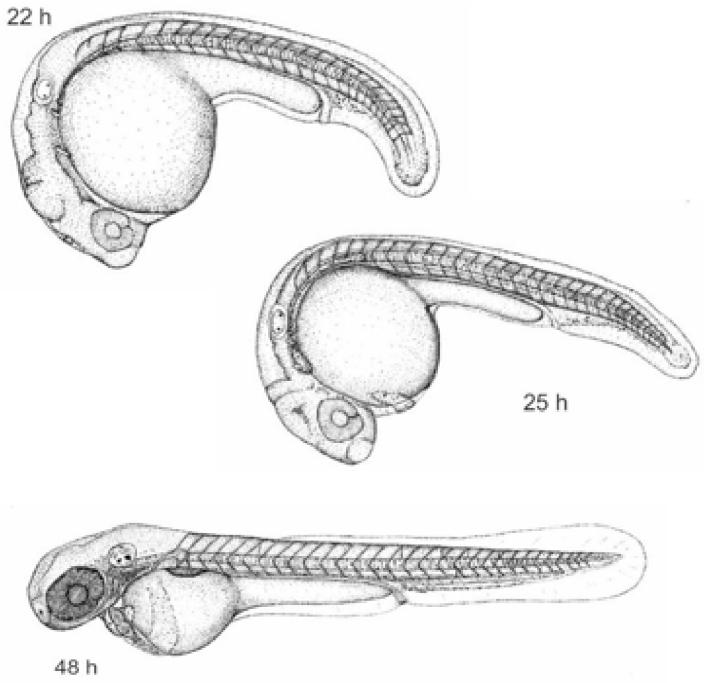
▼M7

Dodatek 3

NORMALEN RAZVOJ CEBRIC PRI 26 °C

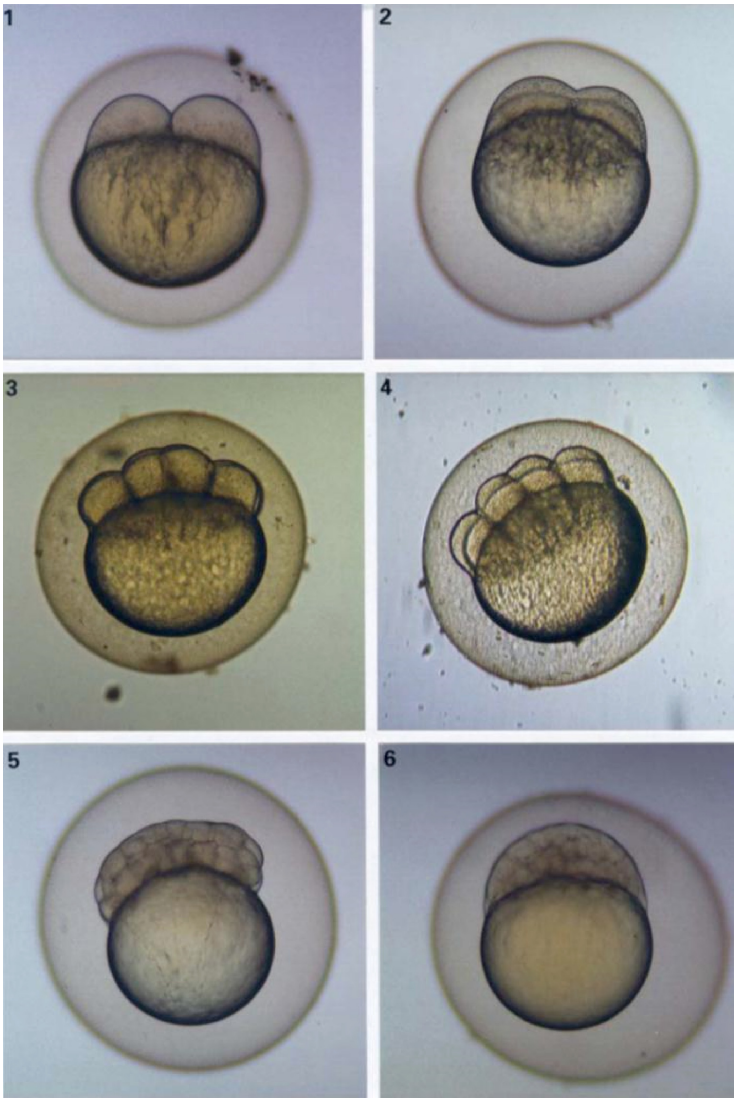


Slika 1: Izbrane faze zgodnjega razvoja cebric (*Danio rerio*): 0,2–1,75 ure po oploditvi (na podlagi Kimmel *in drugi*., 1995 (35)). Za diagnozo oploditve in sposobnosti preživetja iker se lahko uporabi časovno zaporedje normalnega razvoja (glej odstavek 26: Izbira oplojenih iker).



Slika 2: Izbrane faze poznega razvoja cebric (*Danio rerio*) (zarodek, pri katerem se odstrani horij, da se optimizira vidljivost): 22–48 ur po oploditvi (na podlagi Kimmel *in drugi*., 1995 (35)).

▼M7



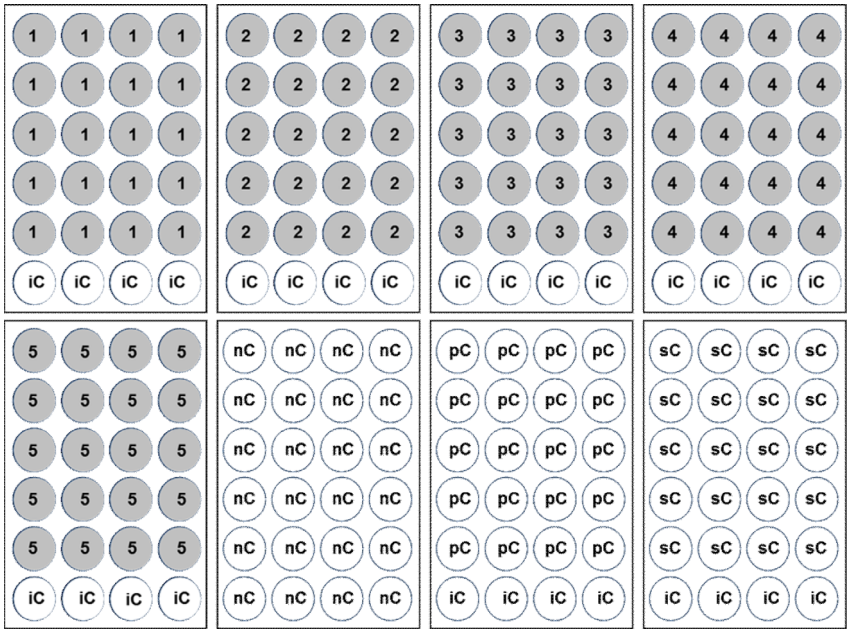
Slika 3: Normalen razvoj zarodkov cebric (*Danio rerio*): (1) 0,75 ure, faza dveh celic; (2) 1 ura, faza štirih celic; (3) 1,2 ure, faza osmih celic; (4) 1,5 ure, faza šestnajstih celic (5) 4,7 ure, začetek epibolije; (6) 5,3 ure, približno 50 % epibolije (na podlagi Braunbeck in Lammer, 2006 (40)).

▼M7

Dodatek 4

Slika 1

Razporeditev plošč s 24 jamicami



1–5 = pet preskusnih koncentracij/kemikalijo,

nC = negativna kontrola (voda za redčenje),

iC = notranja kontrola plošč (voda za redčenje),

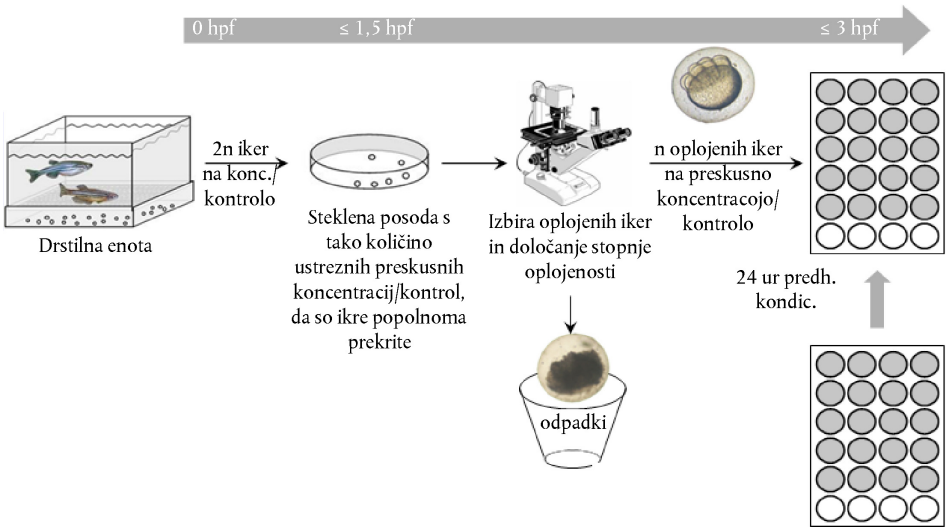
pC = pozitivna kontrola (4 mg/l 3,4-dikloroanilina),

sC = kontrola s topilom

▼M7

Slika 2:

Shema postopka preskusa akutne toksičnosti zarodka cebrice (z leve proti desni): proizvodnja iker, zbiranje iker, predhodna izpostavljenost takoj po oploditvi v steklenih posodah, izbira oplojenih iker z obrnjenim mikroskopom ali binokularnim mikroskopom in porazdelitev oplojenih iker v plošče s 24 jamicami z ustreznimi preskusnimi koncentracijami/kontrolami, n = število iker, potrebnih za posamezno preskusno koncentracijo/kontrolo (tukaj 20), hpf = ure po oploditvi.



▼M7

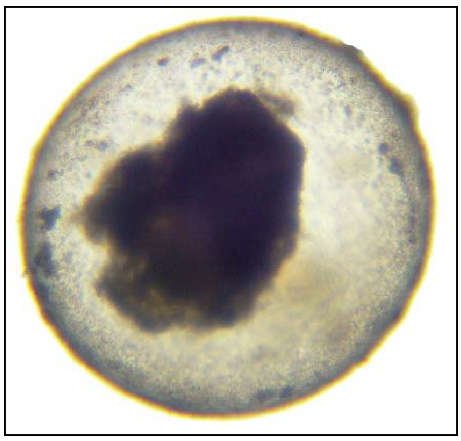
Dodatek 5

ATLAS SMRTONOSNIH KONČNIH TOČK PRI PRESKUSU AKUTNE TOKSIČNOSTI ZARODKA CEBRICE

Naslednje končne točke na višjem nivoju biološke organizacijo pomenijo akutno toksičnost in posledično smrt zarodka: *koagulacija zarodka, odsotnost ločenosti repa, odsotnost oblikovanja somitov in odsotnost srčnega utripa*. Za prikaz teh končnih točk so bili izbrani mikrografi v nadaljevanju.

Slika 1

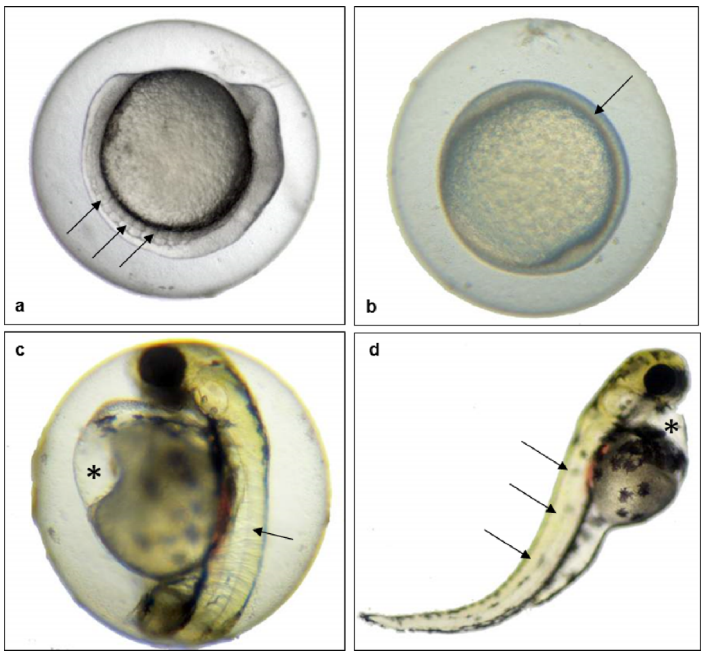
Koagulacija zarodka:



Pri močni osvetlitvi polja so v koaguliranih zarodkih cebric vidne številne neprozorne inkluzije.

Slika 2

Odsotnost oblikovanja somitov:

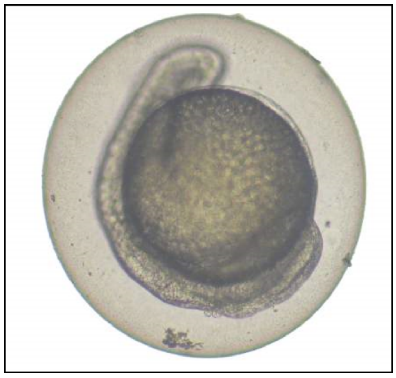


▼M7

Kljub zaostanku pri razvoju za približno 10 ur so na 24 ur starem zarodku cebrice na sliki (a) vidni zelo razviti somiti (→), zarodek na sliki (b) pa ne kaže znakov oblikovanja somitov (→). Čeprav je viden izrazit edem vrečice rumenjaka (*), je na 48 ur starem zarodku cebrice na sliki (c) vidno značilno oblikovanje somitov (→), 96 ur star zarodek cebrice na sliki (d) pa ne kaže znakov oblikovanja somitov (→). Upoštevati je treba tudi ukrivljenost hrbtenice (skoliozo) in perikardialni edem (*) pri zarodku na sliki (d).

Slika 3

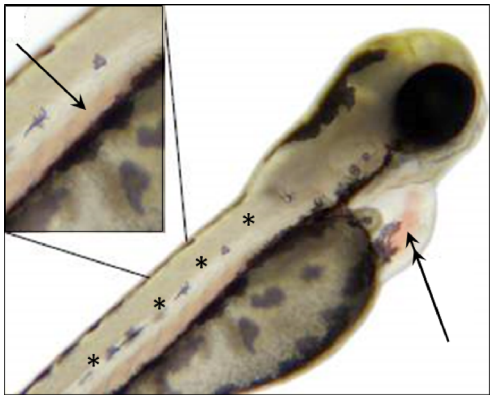
Odsotnost ločenosti repa



v stranskem pogledu (a: →; 96 ur star zarodek cebrice). Upoštevati je treba tudi odsotnost zametka očesa (*).

Slika 4

Odsotnost srčnega utripa



Odsotnost srčnega utripa je že po naravi težko prikazati na mikrografu. Za odsotnost srčnega utripa je značilno, da se srce ne krči (dvojna puščica). Negibnost krvnih celic, na primer v abdominalni aorti (→ na vstavljeni sličici), ni indikator odsotnosti srčnega utripa. Upoštevati je treba tudi odsotnost oblikovanja somitov v tem zarodku (*, homogen videz mišičnega tkiva namesto razčlenjenega). Čas opazovanja, da se zabeleži odsotnost srčnega utripa, mora trajati vsaj eno minuto pri vsaj 80-kratni povečavi.

▼M7

C.50 Preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 238 (2014). Namenjena je ocenjevanju toksičnosti kemikalij za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*), vrsto potopljene vodne dvokaličnice iz družine rmanca. Temelji na obstoječi preskusni metodi ASTM (1), ki je spremenjena v preskusni sistem brez usedline (2), da se oceni intrinzična ekotoksičnost preskusnih kemikalij (neodvisno od porazdelitve in obnašanja preskusne kemikalije med vodo in usedlino). Preskusni sistem brez usedline ni zelo analitsko zapleten (le v vodni fazi), rezultati pa se lahko analizirajo vzporedno in/ali v primerjavi z rezultati, pridobljenimi pri preskusu za *Lemna sp.* (3), poleg tega zahtevani sterilni pogoji zagotavljajo čim manjši učinek mikroorganizmov in alg (sprejemanja kemikalij/razgradnje itd.). Ta preskus ne nadomešča drugih preskusov toksičnosti v vodnem okolju, temveč jih dopolnjuje, da se omogoči podrobnejša ocena nevarnosti in tveganj za vodne rastline. Ta preskusna metoda je bila validirana s krožnim testom (4).

2. Podrobno je opisano preskušanje z zamenjavo testne raztopine (polstatični preskus) ali brez zamenjave (statični preskus). Glede na cilje preskusa in regulativne zahteve se priporoča uporaba polstatične metode, npr. za snovi, ki hitro izginjajo iz raztopine zaradi izhlapevanja, adsorpcije, fotorazgradnje, hidrolize, obarjanja ali biološke razgradnje. Več navodil je na voljo v (5). Ta preskusna metoda se uporablja za snovi, za katere je bila preskusna metoda validirana (glej podrobnosti iz poročila o krožnem testu (4)), ali za pripravke ali znane zmesi, če pa se preskuša zmes, morajo biti njene sestavine čim bolj opredeljene in kvantificirane. Preskusna metoda za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline dopolnjuje preskus toksičnosti vode in usedline za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) (6). Pred uporabo preskusne metode za preskušanje zmesi v regulativne namene je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Tega ni treba storiti, če obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi.

NAČELO PRESKUSA

3. Stalno rastoče rastlinske kulture klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) (le v spremenjenem gojišču po Andrewsu, glej Dodatek 2) lahko rastejo kot monokulture v različnih koncentracijah preskusne kemikalije v obdobju 14 dni v preskusnem sistemu brez usedline. Cilj preskusa je kvantificirati učinke kemikalije na vegetativno rast v tem obdobju na podlagi izbranih merjenih spremenljivk. Merjene spremenljivke so večanje dolžine poganjka, stranskih vej in korenin, razvoj sveže in suhe teže ter povečanje števila spiralasto razvrščenih listov. Poleg tega se upoštevajo značilne kvalitativne spremembe preskusnih organizmov, kot so iznakaženost ali kloroza in nekroza, indikator katerih je rumenenje ali bela in rjava barva. Učinki, odvisni od kemikalije, se kvantificirajo tako, da se rast v testnih raztopinah primerja z rastjo v kontrolah, nato pa se določi koncentracija, ki povzroča določeno x-odstotno zaviranje rasti, in izrazi kot EC_x, pri čemer je lahko „x“ katera koli vrednost, kar je odvisno od regulativnih zahtev, npr. EC_{10}, EC_{20} in EC_{50}. Upoštevati je treba, da so ocene vrednosti EC_{10} in EC_{20} zanesljive in primerne le pri preskusih, pri katerih so koeficienti variacije pri kontrolnih rastlinah nižji od ravni učinka, ki se ocenjuje, kar na primer pomeni, da morajo biti koeficienti variacije pri okvirni oceni vrednosti EC_{20} manjši od 20 %.

4. Določiti je treba tako povprečno specifično hitrost rasti (ocenjeno na podlagi ocen dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk) kot prirast (ocenjen na podlagi povečanja dolžine glavnega poganjka in treh

▼M7

dodatnih merjenih spremenljivk) netretiranih in tretiranih rastlin. Specifična hitrost rasti (r) in prirast (y) se nato uporabita za določitev E_rC_x (npr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) oziroma E_yC_x (npr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Poleg tega se lahko statistično določita najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

6. Na voljo mora biti analitska metoda, ki je dovolj občutljiva, da se kvantificira preskusna kemikalija v preskusnem gojišču. Informacije o preskusni kemikaliji, ki so lahko koristne za določitev preskusnih pogojev, so med drugim strukturna formula, čistost in nečistoče, topnost v vodi, obstojnost v vodi in na svetlobi, disociacijska konstanta kisline (pK_a), porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}), parni tlak in biološka razgradljivost. Topnost v vodi in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so med preskusnim obdobjem verjetne znatne izgube preskusne kemikalije. To pripomore k odločitvi o sprejetju ukrepov za nadzorovanje takih izgub. Če so informacije o topnosti in obstojnosti preskusne kemikalije nejasne, se priporoča, da se ocenita v pogojih preskusa, tj. v gojišču, pri temperaturi in režimu osvetlitve, ki se bodo uporabili v preskusu.

7. Nadzorovanje vrednosti pH preskusnega gojišča je še posebej pomembno na primer pri preskušanju kovin ali snovi, ki so hidrolitično neobstojne. Dodatna navodila za preskušanje kemikalij s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki otežujejo njihovo preskušanje, so na voljo v Smernicah OECD (5).

VELJAVNOST PRESKUSA

8. Da je preskus veljaven, mora biti podvojitveni čas dolžine glavnega poganjka v kontroli krajši od 14 dni. To merilo se lahko izpolni z uporabo statičnega ali polstatičnega preskusnega režima ter gojišč in preskusnih pogojev, opisanih v tej preskusni metodi.

9. Povprečni koeficient variacije za prirast, ki temelji na meritvah sveže teže poganjka (tj. od začetka do konca preskusa), in dodatne merjene spremenljivke (glej odstavek 37) v kontrolnih kulturah med ponovljenimi vzorci niso večji od 35 %.

10. Več kot 50 % ponovljenih vzorcev iz kontrolne skupine je med 14-dnevnim obdobjem izpostavljenih v sterilnih pogojih, kar pomeni, da se zanje lahko s prostim očesom oceni, da niso kontaminirani z drugimi organizmi, kot so alge, glive in bakterije (bistra raztopina). *Opomba*: navodila za ocenjevanje sterilnosti so na voljo v poročilu o krožnem testu (4).

REFERENČNA KEMIKALIJA

11. Referenčne kemikalije, kot je na primer 3,5-diklorofenol, uporabljen pri krožnem testu (4), se lahko preskusijo, da se preveri preskusni postopek, na podlagi podatkov krožnega testa pa je aritmetično povprečje vrednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola za različne spremenljivke odziva (glej odstavke od 37 do 41 te preskusne metode) med 3,2 mg/l in 6,9 mg/l (za podrobne podatke o intervalu zaupanja za navedene vrednosti glej poročilo o krožnem testu). Priporočljivo je, da se referenčna kemikalija preskusi najmanj dvakrat letno oziroma skupaj z določanjem toksičnosti preskusne kemikalije, kadar se preskušanja izvajajo redkeje.

▼M7

OPIS METODE

Oprema

12. Vsa oprema v stiku s preskusnimi gojišči mora biti izdelana iz stekla ali drugega kemijsko inertnega materiala. Steklene posode za gojenje in preskušanje je treba očistiti kemičnih onesnaževalcev, ki bi lahko pronicali v preskusno gojišče, poleg tega pa morajo biti sterilne. Preskusne posode morajo biti dovolj dolge, da lahko poganjki v kontrolnih posodah rastejo v vodni fazi, ne da bi na koncu preskusa dosegli gladino preskusnega gojišča. Priporoča se uporaba epruvet iz debelega borosilikatnega stekla brez roba z notranjim premerom približno 20 mm in dolžine približno 250 mm z aluminijastimi pokrovčki.

13. Ker spremenjeno gojišče po Andrewsu vsebuje saharozo (ki spodbuja rast gliv in bakterij), je treba testne raztopine pripraviti v sterilnih pogojih. Vse tekočine in opremo je treba pred uporabo sterilizirati. Sterilizacija se izvede s štiriurno obdelavo z vročim zrakom (210 °C) ali dvajsetminutnim avtoklaviranjem pri 121 °C. Poleg tega je treba vse bučke, posodice, sklede itd. ter drugo opremo tik pred uporabo obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi.

14. Kulture in preskusne posode se ne smejo hraniti skupaj. To se najbolje doseže z ločenimi okoljskimi gojitvenimi komorami, inkubatorji ali prostori. Omogočeno mora biti nadzorovanje osvetljenosti in temperature ter ohranjanje teh parametrov na konstantni ravni.

Preskusni organizem

15. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) je vrsta potopljene vodne dvokaličnice iz družine rmanca. Med julijem in avgustom se nad vodno gladino pojavijo nevpadljivi rožnato-beli cvetovi. Rastline so ukoreninjene s trdnim sistemom korenik in rastejo po celotni severni polobli v evtrofnih, vendar neonesnaženih in bolj apnenčastih stoječih vodah z blatnim substratom. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) ima raje sladko vodo, vendar raste tudi v somornici.

16. Za preskus toksičnosti brez usedline so potrebne sterilne rastline. Če preskusni laboratorij nima navadnih kultur klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*), se lahko sterilni rastlinski material pridobi iz drugega laboratorija ali pa se (nesterilni) rastlinski material odvzame na terenu oziroma pridobi od komercialnega dobavitelja, pri čemer je treba opraviti taksonomsko preverjanje vrste, če se rastline zberejo na terenu. Če se rastline zberejo na terenu ali če jih zagotovi komercialni dobavitelj, jih je treba sterilizirati (1) in najmanj osem tednov pred uporabo vzdrževati v kulturi v gojišču, ki se uporabi za preskušanje. Terenska mesta, kjer se odvzamejo začetne kulture, morajo biti brez očitnih virov kontaminacije. Pri nabiranju klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) na terenu je treba zelo paziti, da se pridobi prava vrsta, zlasti na območjih, na katerih se lahko križa z drugimi vrstami *Myriophyllum*. Če se pridobi iz drugega laboratorija, ga je treba na podoben način vzdrževati tri tedne. V poročilu je treba vedno navesti rastlinski material in vrsto, uporabljeno za preskušanje.

17. Kakovost in enotnost rastlin, ki se uporabijo v preskusu, pomembno vplivata na rezultat preskusa, zato je treba rastline skrbno izbrati. Uporabiti je treba mlade, hitrorastoče rastline, ki nimajo vidnih lezij ali ki niso razbarvane (kloroza). Podrobna navodila o pripravi preskusnega organizma so na voljo v Dodatku 4.

Gojenje

18. Kulture se lahko hranijo pri manjši osvetlitvi in nižji temperaturi (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C), da se zmanjša pogostost vzdrževanja kultur (npr. kadar se za določeno obdobje ne načrtujejo preskusi z vrsto *Myriophyllum*). Podrobna navodila o gojenju so na voljo v Dodatku 3.

▼M7

19. Vsaj 14 do 21 dni pred preskušanjem je treba zadostno število preskusnih organizmov aseptično prenesti v sveže sterilno gojišče in jih od 14 do 21 dni gojiti v pogojih preskusa kot predkulturo. Podrobna navodila o pripravi predkulture so na voljo v Dodatku 4.

Preskusno gojišče

20. Za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) se v preskusnem sistemu brez usedline priporoča le eno hranilno gojišče, kot je opisano v Dodatku 2. Za gojenje in preskušanje klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) se priporoča, da se spremeni gojišče po Andrewsu, kot je opisano v (1). Iz petih ločeno pripravljenih hranilnih osnovnih raztopin z dodatkom 3 % saharoze se pripravi spremenjeno gojišče po Andrewsu. Podrobna navodila o pripravi gojiščapredkulture so na voljo v Dodatku 2.

21. Za pridobitev testnih raztopin je potrebno desetkratno koncentrirano gojišče po Andrewsu (po potrebi z razredčitvijo). Sestava tega gojišča je opisana v Dodatku 2.

Testne raztopine

22. Testne raztopine se običajno pripravijo z razredčitvijo osnovne raztopine. Osnovne raztopine preskusne kemikalije se običajno pripravijo tako, da se kemikalija raztopi v demineralizirani (tj. destilirani ali deionizirani) vodi. Hranilne snovi se dodajo prek desetkratno koncentriranega spremenjenega gojišča po Andrewsu.

23. Osnovne raztopine preskusne kemikalije se lahko 20 minut sterilizirajo z avtoklavom pri 121 °C ali s filtrsko sterilizacijo, če uporabljen način sterilizacije ne spremeni narave preskusne kemikalije. Testne raztopine se lahko pripravijo tudi v sterilni demineralizirani vodi ali gojišču v sterilnih pogojih. Pri izbiri postopka sterilizacije osnovnih raztopin preskusne kemikalije je treba upoštevati toplotno obstojnost in adsorpcijo na različnih površinah. Zato se priporoča, da se osnovne raztopine pripravijo v sterilnih pogojih, tj. z uporabo sterilnega materiala za raztapljanje preskusne kemikalije v sterilnih pogojih (npr. sterilizacija z ognjem, laminarnimi komorami itd.) v sterilni vodi. Ta način priprave sterilnih osnovnih raztopin se uporablja tako za snovi kot za zmesi.

24. Najvišja preskušana koncentracija preskusne kemikalije običajno ne sme preseči svoje topnosti v vodi v preskusnih pogojih. Za preskusne kemikalije z majhno topnostjo v vodi bo morda treba pripraviti koncentrirano osnovno raztopino ali dispergirati kemikalijo s pomočjo organskega topila ali disperzijskega sredstva, da se omogoči dodajanje točnih količin preskusne kemikalije v preskusno gojišče ter da se olajšata njeno dispergiranje in raztapljanje. Čim bolj si je treba prizadevati, da se izogne uporabi takšnih snovi. Uporaba pomožnih topil ali disperzijskih sredstev ne sme povzročiti fitotoksičnosti. Pogosto uporabljeni topili, ki ne povzročata fitotoksičnosti pri koncentracijah do 100 µl/l, sta na primer aceton in dimetilformamid. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba končno koncentracijo navesti v poročilu in jo ohranjati na najnižji ravni (≤ 100 µl/l), vse tretirane in kontrolne skupine morajo vsebovati enako koncentracijo topila ali disperzijskega sredstva. Dodatna navodila o uporabi disperzijskih sredstev so na voljo v (5).

Preskusne in kontrolne skupine

25. Pri izbiri primernih preskusnih koncentracij je v pomoč predhodno poznavanje toksičnosti preskusne kemikalije za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) na podlagi podatkov iz preskusa za določanje območja delovanja.

▼M7

Pri končnem preskusu toksičnosti mora običajno biti od pet (kot v preskusu zaviranja rasti pri vrsti *Lemna*, glej poglavje C.26 te priloge) do sedem preskusnih koncentracij, urejenih v geometrijske serije, izbrati pa jih je treba tako, da so vrednosti NOEC in EC_{50} v območju koncentracije (glej v nadaljevanju). Faktor separacije med preskusnimi koncentracijami po možnosti ne sme biti večji od 3,2, vendar se lahko uporabi večja vrednost, če je krivulja koncentracija–odziv ravna. Če se uporabi manj kot pet koncentracij, je treba to utemeljiti. Za vsako preskusno koncentracijo je treba uporabiti najmanj pet ponovljenih vzorcev.

26. Pri določevanju območja preskusnih koncentracij (pri preskusu za določanje območja delovanja in/ali pri dokončnem preskusu toksičnosti) je treba proučiti naslednje možnosti:

Za določitev EC_x z ustrezno ravnijo zaupanja morajo preskusne koncentracije oklepati vrednost EC_x. Če se na primer ocenjuje EC_{50}, mora biti najvišja preskusna koncentracija višja od vrednosti EC_{50}. Če je vrednost EC_{50} zunaj območja preskusnih koncentracij, bodo povezani intervali zaupanja veliki in pravilna ocena statističnega ujemanja modela morda ne bo mogoča.

Če je cilj ocena vrednosti LOEC/NOEC, mora biti najnižja preskusna koncentracija dovolj nizka, da rast ni bistveno manjša od rasti v kontroli. Poleg tega mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj visoka, da je rast bistveno manjša od rasti v kontroli. V nasprotnem primeru bo treba preskus ponoviti z drugačnim območjem koncentracije (razen če je najvišja koncentracija na meji topnosti ali najvišji zahtevani mejni koncentraciji, npr. 100 mg/l).

27. Vsak preskus mora vključevati kontrole, ki jih sestavljajo isto hranilno gojišče, preskusni organizem (izbrati je treba čim bolj homogen rastlinski material, sveže stranske veje iz predkultur, skrajšane na 2,5 cm od dna), okoljske razmere in postopki kot pri preskusnih posodah, vendar ne vsebujejo preskusne kemikalije. Če se uporablja pomožno topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba vključiti dodatno tretiranje kontrole s topilom/disperzijskim sredstvom, ki je prisotno v enaki koncentraciji kot v posodah s preskusno kemikalijo. Zagotoviti je treba vsaj deset kontrolnih posod s ponovljenimi vzorci (in posod s topilom, kjer je ustrezno).

28. Če ni treba določiti vrednosti NOEC, se načrt preskusa lahko spremeni tako, da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovljenih vzorcev na koncentracijo. Kljub temu je treba v vsakem primeru zagotoviti najmanj deset kontrolnih ponovljenih vzorcev.

Izpostavljenost

29. Sveže stranske veje iz predkulture, skrajšane na 2,5 cm od dna, se naključno porazdelijo v preskusne posode v aseptičnih pogojih, v vsaki preskusni posodi pa mora biti ena stranska veja, dolga 2,5 cm, z rastnim vršičkom na enem koncu. V vseh preskusnih posodah mora biti izbrani rastlinski material enake kakovosti.

30. Za inkubator je treba uporabiti načrt naključne porazdelitve preskusnih posod, da se čim bolj zmanjša vpliv prostorskih razlik v temperaturi in obsevanosti. Pri beleženju opažanj je potreben tudi načrt preskusa z bloki ali naključna prerazporeditev posod (ali pogostejše prerazporejanje).

31. Če predhodni preskus obstojnosti pokaže, da koncentracije preskusne kemikalije med trajanjem preskusa (14 dni) ni mogoče ohranjati (tj. izmerjena koncentracija pade pod 80 % na začetku izmerjene koncentracij), se priporoča uporaba polstatičnega preskusnega režima. V tem primeru je treba

▼M7

rastline vsaj enkrat med preskusom (npr. 7. dan) izpostaviti sveže pripravljenim testnim in kontrolnim raztopinam. Pogostost izpostavitve svežemu gojišču je odvisna od obstojnosti preskusne kemikalije, kar pomeni, da bo za ohranjanje približno nespremenljivih koncentracij zelo neobstojnih ali hlapnih kemikalij potrebna večja pogostost.

32. Izpostavitev s foliarnim nanosom (pršenjem) ni obravnavana v tej preskusni metodi.

Preskusni pogoji

33. Uporabiti je treba toplo in/ali hladno belo fluorescenčno osvetlitev, da se zagotovi obsevanost s svetlobo v območju približno 100–150 μE m^{-2} s^{-1}, ko se meri kot fotosintetsko aktivno sevanje (400–700 nm) na točkah, ki so enako oddaljene od svetlobnega vira kot od dna preskusnih posod (enakovredno približno 6 000–9 000 luksom), ter cikel svetlobe in teme v razmerju 16: 8 ur. Metoda zaznavanja in merjenja svetlobe, zlasti vrsta tipala, vpliva na izmerjeno vrednost. Sferična tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad in pod ravnino merjenja) in „kosinusna“ tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad ravnino merjenja) so primernejša od enosmernih tipal in omogočajo višje odčitke v primeru večtočkovnih svetlobnih virov vrste, ki je opisana tu.

34. Temperatura v preskusnih posodah mora znašati 23 °C ± 2 °C. Posebno pozornost je treba nameniti spreminjanju vrednosti pH v posebnih primerih, na primer pri preskušanju nestabilnih kemikalij ali kovin, vrednost pH pa mora ostati v območju od 6 do 9. Za dodatna navodila glej (5).

Trajanje

35. Preskus se prekine 14 dni po prenosu rastlin v preskusne posode.

Meritve in analitske določitve

36. Ob začetku preskusa je glavni poganjek preskusnega organizma dolg 2,5 cm (glej odstavek 29), izmeri se z ravnilom (glej Dodatek 4) ali s fotografijo in analizo slik. Dolžino glavnega poganjka preskusnega organizma, ki se zdi običajna ali neobičajna, je treba določiti na začetku preskusa, vsaj enkrat med štirinajstdnevnim obdobjem izpostavljenosti in na koncu preskusa. Opomba: če se delovna miza sterilizira, preden se v preskusne posode dodajo rastline, se lahko za merjenje dolžine glavnega poganja na začetku preskusa in med preskusom kot nadomestna možnost analizi slik uporabi sterilno ravnilo. Zabeležiti je treba spremembe pri razvoju rastline, npr. spremembe v deformaciji poganjkov in videzu, znakih nekroze in kloroze, razpadanju ali izgubi plovnosti ter dolžini in videzu korenin. Zabeležiti je treba tudi bistvene značilnosti preskusnega gojišča (npr. prisotnost neraztopljenega materiala ter rast alg, gliv in bakterij v preskusni posodi).

37. Poleg določitev dolžine glavnega poganjka med preskusom je treba oceniti tudi učinke preskusne kemikalije na tri naslednje merjene spremenljivke (ali več):

i. skupno dolžino stranskih vej,

ii. skupno dolžino poganjka,

iii. skupno dolžino korenin,

iv. svežo težo,

v. suho težo,

vi. število spiralasto razvrščenih listov.

▼M7

Opomba 1: Opažanja med preskusom za določanje območja delovanja so lahko v pomoč pri izbiranju ustreznih dodatnih meritev med zgoraj navedenimi šestimi spremenljivkami.

Opomba 2: Zelo je zaželena določitev sveže in suhe teže (parametra iv in v).

Opomba 3: Ker lahko saharoza in svetloba (izpostavljenost korenin svetlobi med preskusom) vplivata na prenašalce avksina (rastlinskega rastnega hormona) in ker lahko nekatere kemikalije delujejo na podoben način kot avksin, je vključitev končnih točk korenin (parameter iii) vprašljiva.

Opomba 4: Rezultati krožnega testa izkazujejo visoke koeficiente variacije (> 60 %) za skupno dolžino stranskih vej (parameter i). Skupna dolžina stranskih vej je v vsakem primeru zajeta v meritev skupne dolžine poganjka (parameter ii), ki prikazuje bolj sprejemljive koeficiente variacije, ki so manjši od 30 %.

Opomba 5: Na podlagi zgoraj navedenih preudarkov so priporočljive končne točke meritev skupna dolžina poganjka, sveža teža in suha teža (parametri ii, iv in v), parameter vi (število spiralasto razvrščenih listov) pa je prepuščen presoji eksperimentatorja.

38. Prednost dolžine glavnega poganjka in števila spiralasto razvrščenih listov je, da se lahko s fotografijo in analizo slik določita za vsako preskusno in kontrolno posodo na začetku preskusa, med njim in na koncu preskusa, čeprav se lahko uporabi tudi (sterilno) ravnilo.

39. Skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina korenin (kot vsota dolžine vseh stranskih vej ali korenin) in skupna dolžina poganjka (kot vsota dolžine glavnega poganjka in skupne dolžine stranskih vej) se lahko izmerijo z ravnilom na koncu izpostavljenosti.

40. Svežo in/ali suho težo je treba določiti na začetku preskusa iz vzorca predkulture, ki je reprezentativen za material, s katerim se preskus začne, in na koncu preskusa z rastlinskim materialom iz vsake preskusne in kontrolne posode.

41. Skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina poganjka, skupna dolžina korenin, sveža teža, suha teža in število spiralasto razvrščenih listov se lahko določijo po naslednjih postopkih:

i. Skupna dolžina stranskih vej: dolžina stranskih vej se lahko določi tako, da se na koncu izpostavljenosti z ravnilom izmerijo vse stranske veje. Skupna dolžina stranskih vej je vsota vseh stranskih vej v vsaki preskusni in kontrolni posodi.

ii. Skupna dolžina poganjka: dolžina glavnega poganjka se lahko določi z analizo slik ali ravnilom. Skupna dolžina poganjka je vsota skupne dolžine stranskih vej in dolžine glavnega poganjka v vsaki preskusni in kontrolni posodi na koncu izpostavljenosti.

iii. Skupna dolžina korenin: dolžina korenin se lahko določi tako, da se na koncu izpostavljenosti z merilom izmerijo vse korenine. Skupna dolžina korenin je vsota dolžine vseh korenin v vsaki preskusni in kontrolni posodi.

iv. Sveža teža: sveža teža se lahko določi s tehtanjem preskusnih organizmov na koncu izpostavljenosti. Ves rastlinski material iz vsake

▼M7

preskusne in kontrolne posode se spere z destilirano vodo in do suhega popivna s celuloznim papirjem. Po tej pripravi se sveža teža določi s tehtanjem. Začetna biomasa (sveža teža) se določi na podlagi vzorca preskusnih organizmov, ki se vzame iz serije, ki se uporablja za inokulacijo preskusnih posod.

v. Suha teža: po pripravah za določanje sveže teže se preskusni organizmi pri 60 °C posušijo na konstantno težo. Ta masa je suha teža. Začetna biomasa (suha teža) se določi na podlagi vzorca preskusnih organizmov, ki se vzame iz serije, ki se uporablja za inokulacijo preskusnih posod.

vi. Število spiralasto razvrščenih listov: preštejejo se vsi spiralasto razvrščeni listi vzdolž glavnega poganjka.

Pogostost meritev in analitskih določitev

42. Če se uporabi načrt statičnega preskusa, je treba na začetku in na koncu preskusa izmeriti vrednost pH pri vsakem tretiranju. Če se uporabi načrt polstatičnega preskusa, je treba vrednost pH izmeriti za vsako serijo „sveže“ testne raztopine pred vsako zamenjavo in za ustrezno „izrabljeno“ raztopino.

43. Obsevanost je treba meriti v rastni komori, inkubatorju ali prostoru na točkah, ki so enako oddaljene od svetlobnega vira kot preskusni organizmi. Izmeriti jo je treba vsaj enkrat med preskusom. Najmanj dnevno (ali stalno z zapisovalnikom podatkov) je treba beležiti temperaturo gojišča v nadomestni posodi, ki je v enakih pogojih, v rastni komori, inkubatorju ali prostoru.

44. Med preskusom se v primernih intervalih določajo koncentracije preskusne kemikalije. Pri statičnih preskusih je treba koncentracije določiti vsaj na začetku in na koncu preskusa.

45. Pri polstatičnih preskusih, pri katerih se ne pričakuje, da bodo koncentracije preskusnih kemikalij ostale v območju ± 20 % nominalne koncentracije, je treba analizirati vse sveže pripravljene testne raztopine in enake raztopine pri vsaki zamenjavi. Vendar pa se lahko pri preskusih, pri katerih izmerjene začetne koncentracije preskusnih kemikalij niso v območju ± 20 % nominalne koncentracije, a obstajajo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetne koncentracije), kemijske določitve opravijo le na najvišji in najnižji preskusni koncentraciji. V vseh primerih je treba določitev preskusnih koncentracij pred zamenjavo opraviti le pri eni posodi s ponovljenimi vzorci za vsako preskusno koncentracijo (ali združene vsebine posod posameznih ponovljenih vzorcev).

46. Če so na voljo dokazi, da se je preskusna koncentracija med celotnim preskusom zadovoljivo ohranjala v območju ± 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije, lahko analiza rezultatov temelji na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih. Če odklon od nominalne ali izmerjene začetne koncentracije ni v območju ± 20 %, mora analiza rezultatov temeljiti na geometrijski srednji koncentraciji med izpostavljenostjo ali modelih, ki opisujejo zmanjševanje koncentracije preskusne kemikalije (5).

Mejni preskus

47. V nekaterih okoliščinah, npr. kadar predhodni preskus pokaže, da preskusna kemikalija nima toksičnih učinkov pri koncentracijah do 100 mg/l ali do svoje meje topnosti v preskusnem gojišču ali v primeru pripravka do meje razpršljivosti, se lahko izvede mejni preskus, ki vključuje primerjavo odzivov v kontrolni skupini in eni tretirani skupini (100 mg/l ali koncentracija, ki je

▼M7

enaka meji topnosti). Zelo se priporoča, da se ta preskus podpre z analizo koncentracije izpostavljenosti. Vsi zgoraj opisani preskusni pogoji in merila za veljavnost veljajo tudi za mejni preskus, le število ponovljenih vzorcev v tretirani skupini je treba podvojiti. Rast v kontrolni in tretirani skupini se lahko analizira s statističnim preskusom za primerjavo povprečij, npr. s Studentovim t-testom.

PODATKI IN POROČANJE

Spremenljivke odziva

48. Namen preskusa je določiti učinke preskusne kemikalije na vegetativno rast klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*). Ta preskusna metoda opisuje dve spremenljivki odziva.

a) Povprečna specifična hitrost rasti: ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi sprememb logaritmov dolžine glavnega poganjka in logaritmov drugih merjenih parametrov, in sicer skupne dolžine poganjka, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov v časovnem obdobju (izraženo v dnevih) v kontrolah in vsaki tretirani skupini. Opomba: povprečne specifične hitrosti rasti ni mogoče izračunati za merjena parametra skupne dolžine stranskih vej in skupne dolžine korenin. Na začetku preskusa preskusni organizem nima stranskih vej in korenin (na podlagi pripravka iz predkulture), kar pomeni, da je začetna vrednost nič, izračun povprečne specifične hitrosti rasti pa ni določen.

b) Prirast: ta spremenljivka odziva se izračuna na osnovi sprememb dolžine glavnega poganjka in sprememb drugih merjenih parametrov, in sicer po možnosti skupne dolžine poganjka, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov in drugih parametrov, če se to zdi koristno, v kontrolah in vsaki tretirani skupini do konca preskusa.

49. Ocene toksičnosti morajo temeljiti na dolžini glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivkah (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov (glej odstavek 37 in opombe 2, 4 in 5 k temu odstavku)), saj lahko nekatere kemikalije bistveno bolj vplivajo na druge merjene spremenljivke kot na dolžino glavnega poganjka. Ta učinek se ne bi zaznal zgolj z izračunom dolžine glavnega poganjka.

Povprečna specifična hitrost rasti

50. Povprečna specifična hitrost rasti se za določeno obdobje za vsak ponovljeni vzorec iz kontrolnih in tretiranih skupin izračuna kot logaritemsko povečanje spremenljivk rasti, in sicer dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk (tj. skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov), po spodnji enačbi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemer je:

μ_{i-j}: povprečna specifična hitrost rasti od časa i do časa j,

N_i: merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času i,

N_j: merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času j,

t: časovno obdobje od i do j.

▼M7

Za vsako tretirano in kontrolno skupino se izračuna aritmetično povprečje hitrosti rasti in oceni varianca.

51. Povprečna specifična hitrost rasti se izračuna za celotno preskusno obdobje (čas „i“ v zgornji enačbi pomeni začetek preskusa, čas „j“ pa konec preskusa). Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo se izračuna aritmetično povprečje specifične hitrosti rasti in oceni varianca. Oceni se tudi presečna hitrost rasti, da se ocenijo učinki preskusne kemikalije, ki se pojavljajo med obdobjem izpostavljenosti (npr. s pregledovanjem logaritemsko transformiranih krivulj rasti).

52. Nato se lahko za vsako preskusno koncentracijo (tretirano skupino) izračuna odstotek zaviranja hitrosti rasti (I_r) po naslednji enačbi:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

pri čemer je:

% Ir: odstotek zaviranja povprečne specifične hitrosti rasti,

μC: aritmetično povprečje za μ v kontroli,

μT: aritmetično povprečje za μ v tretirani skupini.

Prirast

53. Učinki na prirast se določijo na osnovi merjene spremenljivke dolžine glavnega poganjka in treh dodatnih merjenih spremenljivk (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov), ki se lahko določijo v vsaki preskusni posodi na začetku in na koncu preskusa. V primeru sveže teže ali suhe teže se začetna biomasa določi na osnovi vzorca preskusnih organizmov, ki se vzame iz serije, ki se uporablja za inokulacijo preskusnih posod. Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo se izračuna aritmetično povprečje prirasta in oceni varianca. Povprečje odstotka zaviranja prirasta (% I_y) se lahko za vsako tretirano skupino izračuna po naslednji enačbi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

pri čemer je:

% Iy: odstotek zmanjšanja prirasta,

bC: končna biomasa minus začetna biomasa v kontrolni skupini,

bT: končna biomasa minus začetna biomasa v tretirani skupini.

Podvojitveni čas

54. Za določitev podvojitvenega časa (T_d) dolžine glavnega poganjka in izpolnjevanje tega merila za veljavnost (glej odstavek 8) se uporabi naslednja enačba skupaj s podatki iz kontrolnih posod:

$T_d = \ln 2/\mu$

Pri tem je μ povprečna specifična hitrost rasti, ki se določi, kot je opisano v odstavkih od 50 do 52.

▼M7

Izdelava krivulj koncentracija–odziv

55. Izrisati je treba krivulje koncentracija–odziv, ki prikazujejo povprečen odstotek zaviranja spremenljivke odziva (I_r ali I_y, ki se izračuna, kot je prikazano v odstavku 53), in krivuljo logaritemsko transformirane koncentracije preskusne kemikalije.

Ocena vrednosti EC_x

56. Ocene vrednosti EC_x morajo temeljiti na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x) in prirastu (E_yC_x), vsaka od teh vrednosti pa mora temeljiti na dolžini glavnega poganjka in morebitnih dodatnih merjenih spremenljivkah (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov). To je posledica dejstva, da nekatere kemikalije drugače vplivajo na dolžino glavnega poganjka in druge merjene spremenljivke. Želeni parametri toksičnosti so zato štiri vrednosti EC_x za vsako izračunano raven zaviranja x, in sicer E_rC_x (dolžina glavnega poganjka), E_rC_x (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov), E_yC_x (dolžina glavnega poganjka) in E_yC_x (tj. po možnosti skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov).

57. Opozoriti je treba, da vrednosti EC_x, izračunane na podlagi teh dveh spremenljivk odziva, niso primerljive, to razliko pa je treba upoštevati pri uporabi rezultatov preskusa. Če se upoštevajo preskusni pogoji iz te preskusne metode, bodo vrednosti EC_x, ki temeljijo na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x), v večini primerov višje od rezultatov, ki temeljijo na prirastu (E_yC_x) zaradi matematične osnove teh pristopov. Ta razlika se ne sme razlagati kot razlika v občutljivosti obeh spremenljivk odziva, saj enostavno izvira iz različne matematične narave vrednosti.

Statistični postopki

58. Cilj je kvantificirati odziv na koncentracijo z regresijsko analizo. Po linearni transformaciji podatkov o odzivu se lahko uporabi tehtana linearna regresija, na primer v probit ali logaritemskih ali Weibullovih enotah (7), vendar so nelinearni regresijski postopki primernejše tehnike, ki bolje obravnavajo neizogibne nepravilnosti in odstopanja podatkov od enakomernih porazdelitev. Če se te nepravilnosti približujejo ničelnemu ali popolnemu zaviranju, se lahko s transformacijo povečajo in ovirajo analizo (7). Opozoriti je treba, da so standardne metode probit analize, logaritemske analize ali Weibullove transformacije namenjene uporabi pri kvantnih podatkih (npr. za umrljivost ali preživetje), zato jih je treba prilagoditi za uporabo na podatkih o hitrosti rasti ali prirastu. Specifični postopki za določanje vrednosti EC_x na podlagi kontinuiranih podatkov so na voljo v (8), (9) in (10).

59. Za vsako spremenljivko odziva, ki se bo analizirala, se izračuna točkovna ocena vrednosti EC_x, pri čemer se uporabi razmerje med odzivom in koncentracijo. Kadar je to mogoče, se za vsako oceno določijo 95-odstotne meje zaupanja. Grafično ali statistično je treba oceniti, kako se podatki o odzivu prilegajo regresijskemu modelu. Regresijsko analizo je treba opraviti na odzivih posameznih ponovljenih vzorcev in ne na povprečjih tretiranih skupin.

60. Ocene EC_{50} in meje zaupanja se lahko pridobijo tudi z linearno interpolacijo s samovzorčenjem (10), če razpoložljivi regresijski modeli/metode niso primerni za podatke.

61. Za oceno vrednosti LOEC in s tem tudi vrednosti NOEC je treba primerjati povprečja tretiranih skupin s tehnikami analize variance (ANOVA). Povprečje za vsako koncentracijo se nato primerja s povprečjem kontrole z ustrezno metodo večkratne primerjave ali testa trenda. Uporabna sta lahko Dunnettov ali Williamsov test (12) (13) (14) (15) (16). Oceniti je treba, ali velja predpostavka homogenosti varianc v analizi variance. Ta ocena se lahko izvede grafično ali s formalnim preskusom (15). Primerna testa sta Levenejev ali Bartlettov test. Če predpostavka homogenosti varianc ni izpolnjena, se lahko ponekod to popravi z logaritemsko transformacijo podatkov.

▼M7

Če je heterogenost variance izredno velika in je ni mogoče popraviti s transformacijo, je treba proučiti možnosti analize z metodami, kot je na primer test po Jonckheere-Terpstraju. Dodatna navodila o določanju vrednosti NOEC so na voljo v (10).

62. Na podlagi nedavnega znanstvenega razvoja se priporoča opuščanje koncepta vrednosti NOEC in njegova nadomestitev z regresijsko določenimi točkovnimi ocenami EC_x. Za ta preskus *Myriophyllum* ni bila določena ustrezna vrednost x. Vendar se zdi, da je ustrezno območje od 10 % do 20 % (odvisno od izbrane spremenljivke odziva), po možnosti pa je treba poročati tako o vrednostih EC_{10} in EC_{20} kot o njunih mejah zaupanja.

Poročanje

63. V poročilu o preskusu je treba navesti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB ali zmes:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusne vrste

— Znanstveno ime in vir.

Preskusni pogoji

— Uporabljeni preskusni postopek (statični ali polstatični).

— Datum začetka preskusa in njegovo trajanje.

— Preskusno gojišče.

— Opis načrta poskusa: preskusne posode in pokrovi, količine raztopin in dolžina glavnega poganjka za vsako poskusno posodo na začetku preskusa.

— Preskusne koncentracije (nominalne in izmerjene, kot je ustrezno) in število ponovljenih vzorcev za posamezno koncentracijo.

— Metode priprave osnovnih in testnih raztopin, vključno z uporabo kakršnih kolih topil ali disperzijskih sredstev.

— Temperatura med preskusom.

— Svetlobni vir, obsevanost in homogenost.

— Vrednosti pH preskusnega in kontrolnega gojišča.

— Metoda analize preskusne kemikalije z ustreznimi podatki o oceni kakovosti (validacijske študije, standardni odkloni ali meje zaupanja analiz).

▼M7

— Metode za določanje dolžine glavnega poganjka in drugih merjenih spremenljivk, npr. skupne dolžine stranskih vej, skupne dolžine poganjka, skupne dolžine korenin, sveže teže, suhe teže in števila spiralasto razvrščenih listov.

— Stanje kulture (sterilna ali nesterilna) v vsaki preskusni in kontrolni posodi pri vsakem opazovanju.

— Vsa odstopanja od te preskusne metode.

Rezultati

— Neobdelani podatki: dolžina glavnega poganjka in druge merjene spremenljivke v vsaki preskusni in kontrolni posodi pri vsakem opazovanju in analizi.

— Povprečja in standardni odkloni za vsako merjeno spremenljivko.

— Krivulje rasti za vsako merjeno spremenljivko.

— Izračunane spremenljivke odziva za vsak tretirani ponovljeni vzorec z aritmetičnimi povprečji in koeficientom variacije za ponovljene vzorce.

— Grafična predstavitev razmerja med koncentracijo in učinkom.

— Ocene toksičnih končnih točk za spremenljivke odziva, npr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, in povezani intervali zaupanja. Vrednosti LOEC in/ali NOEC, če sta izračunani, in statistične metode za njuno določitev.

— Če je bila uporabljena analiza variance, velikost opaženega učinka (npr. najmanjša značilna razlika).

— Vsaka stimulacija rasti, opažena pri katerem koli tretiranju.

— Vsi vidni znaki fitotoksičnosti in opažanja testnih raztopin.

— Razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izhajajo iz odstopanj od te preskusne metode.

VIRI

(1) ASTM Designation E 1913-04. Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al*. (2010). *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* št. 22, str. 702–710.

(2) Poglavje C.26 te priloge*: Preskus zaviranja rasti Lemna sp*.

(3) OECD (2014). „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, št. 205, OECD Publishing, Pariz.

(4) OECD (2000). „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 23, OECD Publishing, Pariz.

(5) Poglavje C.51 te priloge: Preskus toksičnosti vode in usedline za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*).

▼**M7**

(6) Christensen, E. R., N. Nyholm (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, zv. 18/9, str. 713–718.

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, zv. 11/2, str. 157–167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, zv. 11/10, str. 1485–1494.

(9) OECD (2006). „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD Publishing, Pariz.

(10) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, zv. 50/272, str. 1096–1121.

(12) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, zv. 20/3, str. 482–491.

(13) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, zv. 27/1, str. 103–117.

(14) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, zv. 28/2, str. 519–531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, zv. 29/2, str. 93–96.

▼M7

Dodatek 1

OPREDELITEV POJMOV

Biomasa je sveža in/ali suha teža žive snovi, prisotne v populaciji. Pri tem preskusu je biomasa vsota glavnega poganjka, vseh stranskih vej in vseh korenin.

Kemikalija je snov ali zmes.

Kloroza je sprememba barve preskusnega organizma, zlasti spiralasto razvrščenih listov, z zelene na rumenkasto.

ECx je koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v preskusnem gojišču, ki povzroči x-odstotno (npr. 50-odstotno) zmanjšanje rasti klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) v ustreznem obdobju izpostavljenosti (navesti v primeru odstopanja od polnega ali običajnega trajanja preskusa). Za nedvoumno označitev vrednosti EC, pridobljene iz hitrosti rasti ali prirasta, se simbol „E_rC“ uporablja za hitrost rasti in simbol „E_yC“ za prirast, sledi pa uporabljena merjena spremenljivka, npr. E_rC (dolžina glavnega poganjka).

Rast je povečanje merjene spremenljivke, npr. dolžine glavnega poganjka, skupne dolžine stranskih vej, skupne dolžine poganjka, skupne dolžine korenine, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov, med preskusnim obdobjem.

Hitrost rasti (povprečna specifična hitrost rasti) je logaritemsko povečanje merjene spremenljivke v obdobju izpostavljenosti. *Opomba*: spremenljivke odziva, povezane s hitrostjo rasti, niso odvisne od trajanja preskusa, če je vzorec rasti neizpostavljenih kontrolnih organizmov eksponenten.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) je najnižja preskušena koncentracija, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek zmanjšanja rasti (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo v navedenem obdobju izpostavljenosti. Vendar bi morale imeti vse koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC).

Merjene spremenljivke so vse vrste spremenljivk, ki se merijo, da se izrazi končna točka preskusa z eno ali več različnimi spremenljivkami odziva. Pri tej preskusni metodi so merjene spremenljivke dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina poganjka, skupna dolžina korenine, sveža teža, suha teža in število spiralasto razvrščenih listov.

Monokultura je kultura z eno rastlinsko vrsto.

Nekroza je mrtvo (tj. belo ali temno rjavo) tkivo preskusnega organizma.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC.

Spremenljivka odziva je spremenljivka za oceno toksičnosti, izpeljana iz katerih koli izmerjenih parametrov, ki opisujejo biomaso, z drugačnim postopkom izračuna. Pri tej preskusni metodi sta hitrost rasti in prirast spremenljivki odziva, izpeljani iz merjenih spremenljivk, kot so dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov.

Polstatični preskus (zamenjava) je preskus, pri katerem se testna raztopina v določenih časovnih presledkih redno menja med preskusom.

▼M7

Statični preskus je preskusna metoda, pri kateri se testna raztopina med preskusom ne zamenja.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

Končna točka preskusa opisuje splošen dejavnik, ki ga preskusna kemikalija spremeni glede na kontrolni vzorec in je cilj preskusa. V tej preskusni metodi je končna točka zaviranje rasti, ki ga lahko izrazimo z različnimi spremenljivkami odziva, ki temeljijo na eni ali več merjenih spremenljivkah.

Preskusno gojišče je popolnoma sintetično gojišče, na katerem preskusne rastline rastejo ob izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Običajno se preskusna kemikalija raztopi v preskusnem gojišču.

UVCB je snov z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkt ali biološki material.

Prirast je vrednost merjene spremenljivke za izražanje biomase na koncu obdobja izpostavljenosti, od katere se odšteje vrednost merjene spremenljivke na začetku obdobja izpostavljenosti. Opomba: če je vzorec rasti neizpostavljenih organizmov eksponenten, se bodo spremenljivke odziva, ki temeljijo na prirastu, zmanjševale, ko se bo čas trajanja preskusa povečeval.

▼M7

Dodatek 2

SPREMENJENO GOJIŠČE PO ANDREWSU ZA ZALOŽNO KULTURO IN PREDKULTURO

Iz petih ločeno pripravljenih hranilnih osnovnih raztopin se pripravi spremenjeno gojišče po Andrewsu z dodatkom 3 % saharoze za založno kulturo in predkulturo.

Preglednica 1

Sestava hranilne raztopine po Andrewsu: (oznaka E 1913-04 ASTM)

Priprava hranilnih osnovnih raztopin			Priprava hranilne raztopine
osnovna raztopina	kemikalija	začetna teža na 1 000 ml	ml na 5 l hranilne raztopine
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	glej osnovno raztopino 3.1 v nadaljevanju		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Osnovne raztopine se lahko v hladilniku hranijo šest mesecev (pri 5–10 °C). Le osnovna raztopina št. 5 ima krajši rok uporabnosti (dva meseca).

Preglednica 2

Priprava osnovne raztopine 3.1 za pripravo osnovne raztopine 3

Kemikalija	Začetna teža v g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Ko se pripravi osnovna raztopina 3.1 (preglednica 2), jo je treba globoko zamrzniti v približno 11 ml alikvotih (pri vsaj –18 °C). Globoko zmrznjeni deli imajo rok uporabnosti petih let.

Za pripravo osnovne raztopine 3 je treba odtajati osnovno raztopino 3.1, z 10 ml osnovne raztopine 3.1 napolniti merilno bučko s prostornino 1 l in dodati ultra čisto vodo do oznake na merilni bučki.

Za pripravo spremenjenega gojišča po Andrewsu je treba merilno bučko s prostornino 5 l napolniti s približno 2 500 ml ultra čiste vode. Ko se doda 50 ml vsake osnovne raztopine, je treba napolniti 90 % merilne bučke z ultra čisto vodo in nastaviti vrednost pH na 5,8.

▼M7

Nato je treba dodati 150 g raztopljene saharoze (3 % na 5 l) in z ultra čisto vodo napolniti merilno bučko do oznake. Nato se hranilna raztopina vlije v bučke Schott s prostornino 1 l in 20 minut avtoklavira pri 121 °C.

Tako pridobljena hranilna raztopina se lahko sterilna hrani v hladilniku (pri 5–10 °C) tri mesece.

Spremenjeno gojišče po Andrewsu za preskus toksičnosti brez usedline

Iz petih hranilnih osnovnih raztopin, navedenih v preglednicah 1 in 2, se pripravi desetkratno koncentrirano spremenjeno gojišče po Andrewsu, ki je potrebno za pridobitev testnih raztopin, z dodatkom 30 % saharoze. Za to je treba merilno bučko s prostornino 1 l napolniti s približno 100 ml ultra čiste vode. Ko se doda 100 ml vsake osnovne raztopine, je treba vrednost pH nastaviti na 5,8. Nato je treba dodati 30 % raztopljene saharoze (300 g na 1 000 ml) in z ultra čisto vodo napolniti merilno bučko do oznake.

Nato se hranilna raztopina vlije v bučke Schott s prostornino 0,5 l in 20 minut avtoklavira pri 121 °C.

Tako pridobljena desetkratno koncentrirana spremenjena hranilna raztopina se lahko sterilna hrani v hladilniku (pri 5–10 °C) tri mesece.

▼M7

Dodatek 3

VZDRŽEVANJE ZALOŽNE KULTURE

V tem Dodatku 3 je opisana založna kultura klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum* L ([1])), vrste potopljene vodne dvokaličnice iz družine rmanca. Med julijem in avgustom se nad vodno gladino pojavijo nevpadljivi rožnato-beli cveti. Rastline so ukoreninjene s trdnim sistemom korenik in rastejo po celotni severni polobli v evtrofnih, vendar neonesnaženih in bolj apnenčastih stoječih vodah z blatnim substratom. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) ima raje sladko vodo, vendar raste tudi v somornici.

Za založno kulturo brez usedline v laboratorijskih pogojih so potrebne sterilne rastline. Na voljo so sterilne rastline iz ekotoksiloškega laboratorija zvezne agencije za okolje Nemčije (Umweltsbundesamt).

Preskusni organizmi se lahko pripravijo tudi iz nesterilnih rastlin v skladu z oznako ASTM E 1913-04. Glej postopek v nadaljevanju za gojenje *Myriophyllum sibiricum*, zbranega na terenu (izvleček iz standardnih smernic ASTM):

„Če se postopek začne z nesterilnimi rastlinami, zbranimi na terenu, se jeseni naberejo zarodni brstiči *Myriophyllum sibiricum*. Zarodni brstiči se položijo v 20-litrski akvarij, ki vsebuje 5 cm sterilne usedline, prekrite s kremenčevim peskom ali na primer z glino Turface® in 18 l vode z reagentom. Akvarij je treba prezračevati ter vzdrževati pri temperaturi 15 °C in hitrosti pretoka delcev od 200 do 300 μmol m^{-2} s^{-1} 16 ur na dan. Rastlinska kultura v akvariju se lahko vzdržuje kot pomožni vir rastlin, če mehanska okvara v termostatirani celici za rast, kontaminacija ali drug dejavnik uničijo kulturo sterilizirane rastline. Rastline, ki rastejo v akvariju, niso sterilne in sterilnih kultur ni mogoče vzdrževati v sistemu za gojenje serij. Za sterilizacijo kulture je treba rastline vzeti iz akvarija in približno 0,5 ure spirati pod tekočo deionizirano vodo. V aseptičnih pogojih v laminarni komori z zračnim tokom se rastline razkužujejo manj kot 20 min (da pobeli večina rastlinskega tkiva in je zelen le še rastoči vršiček) v 3-odstotni (w/v) raztopini natrijevega hipoklorita, ki vsebuje 0,01 % primerne površinsko aktivne snovi. Pretresite razkužilo in rastlinski material. Segmenti z več kolenci se prenesejo v sterilne epruvete za gojenje, ki vsebujejo 45 ml steriliziranega spremenjenega gojišča po Andrewsu, in se zaprejo z navadnimi zamaški za epruvete za gojenje. V vsako preskusno komoro se postavi le en rastlinski segment. Za pritrditev zamaška na posodo s kulturo se uporabi sloj laboratorijskega tesnila. Po vzpostavitvi sterilne kulture je treba segmente rastline z več kolenci vsakih deset do dvanajst dni prestaviti v nove preskusne komore, ki vsebujejo sveže tekoče hranilno gojišče. Kot je prikazano z gojenjem na agarskih ploščah, morajo biti rastline sterilne in ostati sterilne osem tednov pred začetkom preskušanja.“

Ker spremenjeno gojišče po Andrewsu vsebuje saharozo (ki spodbuja rast gliv in bakterij), je treba ves material in raztopine pripraviti v sterilnih pogojih, prav tako pa mora v sterilnih pogojih potekati tudi gojenje. Vse tekočine in opremo je treba pred uporabo sterilizirati. Sterilizacija se izvede s štiriurno obdelavo z vročim zrakom (210 °C) ali dvajsetminutnim avtoklaviranjem pri 121 °C. Poleg tega je treba vse bučke, posodice, sklede itd. ter drugo opremo tik pred uporabo obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi.

Založne kulture se lahko dlje časa vzdržujejo pri manjši osvetlitvi in nižji temperaturi (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C), ne da bi jih bilo treba ponovno vzpostaviti. Gojišče za *Myriophyllum* mora biti enako gojišču, ki se je uporabilo za preskušanje, vendar se lahko za založne kulture uporabijo druga gojišča z veliko hranljivimi snovmi.

([1]) Carl von Linné (*23. maj 1707 Råshult/Älmhult; † 10. januar 1778 Uppsala).

▼M7

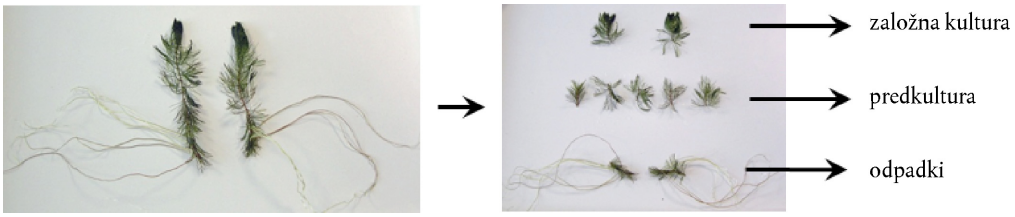
Segmenti rastline se aksenično razdelijo v več 500-mililitrskih erlenmajeric ali/in 2 000-mililitrskih fernbachovih buč, vsaka pa je napolnjena s približno 450 ml oziroma 1 000 ml spremenjenega gojišča po Andrewsu. Nato se bučke zamašijo z zamaški iz celuloze.

Poleg tega je treba opremo tik pred uporabo obvezno obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi. Rastline se glede na število in velikost približno vsake tri tedne prenesejo v svežo hranilno raztopino.

Za to zamenjano kulturo se lahko uporabijo vršički in segmenti srednjega dela stebla. Število in velikost prenesenih rastlin (ali segmentov rastlin) sta odvisna tega, koliko rastlin je potrebnih. Lahko se na primer prenese pet segmentov poganjka v eno fernachovo bučko in trije segmenti poganjka v eno erlenmajerico, vsak od njih pa je dolg 5 cm. Zavreči je treba vse ukoreninjene, cvetoče, mrtve ali druge izstopajoče dele.

Slika 1

Obrezovanje rastlin za založno kulturo in predkulturo po treh tednih gojenja



Rastline se gojijo v 500-mililitrskih erlenmajericah in 2 000-mililitrskih fernbachovih bučkah v hlajenih inkubatorjih pri 20± 2 °C in stalni svetlobi približno 100–150 µE m^{-2} s^{-1} ali 6 000–9 000 luksov (ki jo oddaja razsvetljava v komori z barvno temperaturo „topla bela svetloba“).

Slika 2

Gojenje rastlin v hlajenem inkubatorju z razsvetljavo v komori



Uporabiti je treba kemično čiste (v kislini oprane) in sterilne steklene posode za gojenje, z njimi pa je treba ravnati po aseptičnih metodah. V primeru kontaminacije založne kulture, npr. z algami, glivami in/ali bakterijami, je treba pripraviti novo kulturo ali pa uporabiti založno kulturo iz drugega laboratorija, da se zamenja navedena kultura.

▼M7

Dodatek 4

VZDRŽEVANJE PREDKULTURE IN PRIPRAVA PRESKUSNEGA ORGANIZMA ZA PRESKUŠANJE

Za pridobitev predkulture narežite poganjke iz založne kulture v segmente, ki imajo po dva spiralasto razvrščena lista, nato položite segmente v fernbachove bučke, napolnjene s spremenjenim gojiščem po Andrewsu (s 3 % saharoze). Vsaka bučka lahko vsebuje do 50 segmentov poganjka. Vendar je treba paziti, da so segmenti vitalni in nimajo korenin ali stranskih vej ali zarodnih brstičev (glej sliko 1 v Dodatku 3).

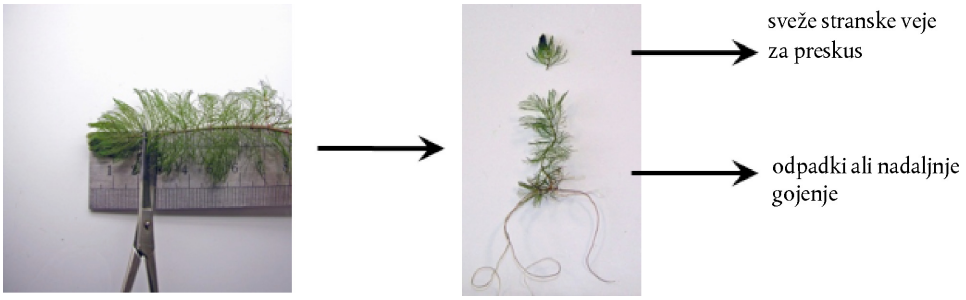
Organizmi iz predkulture se gojijo od 14 do 21 dni v sterilnih pogojih v okoljskih komorah z izmenjujočimi se 16 urami svetlobe in 8 urami teme. Izbrana obsevanost mora biti v območju 100–150 µE m^{-2} s^{-1}. Temperatura preskusnih posod mora biti 23 °C ± 2 °C.

Ker spremenjeno gojišče po Andrewsu vsebuje saharozo (ki spodbuja rast alg, gliv in bakterij), je treba raztopine preskusne kemikalije pripraviti v sterilnih pogojih, v sterilnih pogojih pa mora potekati tudi gojenje. Vse tekočine in opremo je treba pred uporabo sterilizirati. Sterilizacija se izvede s štiriurno obdelavo z vročim zrakom (210 °C) ali dvajsetminutnim avtoklaviranjem pri 121 °C. Poleg tega je treba vse bučke, posodice, sklede itd. ter drugo opremo tik pred uporabo obdelati z ognjem na sterilni delovni mizi.

Poganjki se aksenično vzamejo iz bučk s predkulturami, pri čemer je treba izbrati čim bolj homogen material. Za vsako preskušanje je potrebnih vsaj 60 preskusnih organizmov (preskušanje z osmimi koncentracijami preskusne kemikalije). Za preskušanje je treba iz predkultur vzeti sveže stranske veje, jih skrajšati na 2,5 cm od dna (izmerjeno z ravnilom) in jih premestiti v čašo, ki vsebuje sterilno spremenjeno gojišče po Andrewsu. Te sveže stranske veje se lahko uporabijo za preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline.

Slika 2

Obrezovanje rastlin iz predkulture za preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline.



▼M7

C.51 Preskus toksičnosti vode in usedline za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici za preskušanje OECD 239 (2014). Preskusne metode so na voljo za na površini plavajočo vodno rastlino enokaličnico vrste *Lemna* (1) in za vrsto alg (2). Te metode se redno uporabljajo za zbiranje podatkov za obravnavo tveganja preskusnih kemikalij, zlasti kemikalij s herbicidnim delovanjem, na neciljne vrste vodnih rastlin. Vendar so v nekaterih primerih lahko potrebni podatki za dodatne vrste makrofitov. Nedavne smernice, ki jih je društvo za okoljsko toksikologijo in kemijo (SETAC – Society of Environmental Toxicology and Chemistry) objavilo na podlagi delavnice o oceni tveganja za vodne makrofite zaradi pesticidov (AMRAP), predlagajo, da so morda za ukoreninjene vrste makrofitov potrebni podatki o preskusnih kemikalijah, če je znano, da vodna leča (*Lemna*) in alge niso občutljive na način delovanja ali če je njihova porazdelitev v usedlino razlog za skrb, saj bi povzročila izpostavljenost prek absorpcije skozi korenine (3). Na podlagi trenutnega razumevanja in izkušenj so bile vrste *Myriophyllum* izbrane kot najprimernejše vrste, če so potrebni podatki za potopljene ukoreninjene dvokalične vrste (4) (5) (6). Ta preskus ne nadomešča drugih preskusov toksičnosti v vodnem okolju, temveč jih dopolnjuje, da se omogoči podrobnejša ocena nevarnosti in tveganj za vodne rastline. Preskusna metoda za vodo in usedlino za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) dopolnjuje preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline (7).

2. V tem dokumentu je opisana preskusna metoda, ki omogoča oceno učinkov preskusne kemikalije na ukoreninjeno vodno rastlino vrste *Myriophyllum spicatum*, ki raste v sistemu vode in usedline. Preskusna metoda deloma temelji na obstoječih metodah (1) (2) (8) in upošteva nedavne raziskave, povezane z oceno tveganja za vodne rastline (3). Metoda vode in usedline je bila validirana z mednarodnim krožnim testom, izvedenim z vrstami *Myriophyllum*, ki so rasle v statičnih pogojih in bile izpostavljene preskusni kemikaliji z odmerki prek vodnega stolpca (9). Vendar se lahko preskusni sistem zlahka prilagodi, da se omogoči izpostavljenost prek usedline s primešano preskusno snovjo ali izpostavljenost prek vodne faze v polstatičnem scenariju ali scenariju s pulzirajočim odmerjanjem, čeprav navedena scenarija še nista bila uradno preskušena s krožnim testom. Poleg tega se lahko splošna metoda uporablja za druge ukoreninjene, potopljene in emergentne vrste, med drugim tudi za druge vrste *Myriophyllum* (npr. *Myriophyllum aquaticum*) in *Glyceria maxima* (10). Za alternativne vrste je morda treba spremeniti preskusne pogoje ter načrt in trajanje preskusa. Zlasti je potrebno več dela za opredelitev ustreznih postopkov za vrsto *Myriophyllum aquaticum*. Te možnosti niso podrobno predstavljene v tej preskusni metodi, ki opisuje standardni pristop k izpostavljenosti klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) v statičnem sistemu prek vodne faze.

3. Ta preskusna metoda se uporablja za snovi, za katere je bila preskusna metoda validirana (glej podrobnosti iz poročila o krožnem testu (9)), ali za pripravke ali znane zmesi. Preskus za vrsto *Myriophyllum* se lahko izvede, da se izpolni zahteva po podatkih stopnje 1, ki jo sproži morebitna porazdelitev preskusne kemikalije v usedlino ali težave z načinom delovanja/selektivnostjo. Enako je lahko potreben laboratorijski preskus za vrsto *Myriophyllum* kot del strategije višje stopnje za obravnavo pomislekov, povezanih s tveganjem za vodne rastline. Na podlagi specifičnega razloga za izvajanje preskusa se določi način izpostavljenosti (tj. prek vode ali usedline). Pred uporabo te preskusne metode za preskušanje zmesi v regulativne namene je treba proučiti, ali bo zagotovila sprejemljive rezultate za navedeni namen in, če jih bo, zakaj. Tega ni treba storiti, če obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi.

▼M7

NAČELO PRESKUSA

4. Preskus je namenjen ocenjevanju učinkov, odvisnih od kemikalije, na vegetativno rast rastlin *Myriophyllum*, ki rastejo v standardiziranih gojiščih (voda, usedlina in hranilne snovi). Za ta namen se vršički poganjka zdravih, necvetočih rastlin posadijo v standardizirano, umetno usedlino, ki se dopolni z dodatnimi hranilnimi snovmi, da se zagotovi ustrezna rast rastlin, in nato vzdržuje v gojišču po Smartu in Barku (Dodatek 1). Po obdobju vzpostavitve, ki omogoča oblikovanje korenin, so rastline izpostavljene nizu preskusnih koncentracij, ki se dodajo vodnemu stolpcu. Druga možnost je, da se simulira izpostavljenost prek usedline tako, da se umetni usedlini primeša preskusna kemikalija, rastline pa se presadijo v to usedlino s primešano preskusno snovjo. V obeh primerih se rastline nato 14 dni vzdržujejo v nadzorovanih okoljskih razmerah. Učinki na rast se ugotovijo na podlagi kvantitativnih ocen dolžine poganjka, sveže teže in suhe teže ter kvalitativnih opažanj simptomov, kot so kloroza, nekroza ali deformacije pri rasti.

5. Učinki, odvisni od kemikalije, se kvantificirajo tako, da se rast v testnih raztopinah primerja z rastjo kontrolnih rastlin, nato pa se določi koncentracija, ki povzroča navedeno x-odstotno zaviranje rasti, in izrazi kot EC_x, pri čemer je lahko „x“ katera koli vrednost, kar je odvisno od regulativnih zahtev, npr. EC_{10}, EC_{20} in EC_{50}. Upoštevati je treba, da so ocene vrednosti EC_{10} in EC_{20} zanesljive in primerne le pri preskusih, pri katerih so koeficienti variacije pri kontrolnih rastlinah nižji od ravni učinka, ki se ocenjuje, kar na primer pomeni, da morajo biti koeficienti variacije pri okvirni oceni vrednosti EC_{20} manjši od 20 %.

6. Določiti je treba tako povprečno specifično hitrost rasti (ocenjeno na podlagi ocen dolžine, sveže teže in suhe teže poganjka) kot prirast (ocenjen na podlagi povečanja dolžine, sveže teže in suhe teže poganjka) netretiranih in tretiranih rastlin. Specifična hitrost rasti (r) in prirast (y) se nato uporabita za določitev E_rC_x (npr. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) oziroma E_yC_x (npr. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Po potrebi se lahko na podlagi ocen povprečne specifične hitrosti rasti in prirasta določita najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) in koncentracija brez opaznega učinka (NOEC).

INFORMACIJE O PRESKUSNI KEMIKALIJI

8. Na voljo mora biti analitska metoda z zadostno občutljivostjo za kvantifikacijo kemikalij v preskusnem gojišču.

9. Informacije o preskusni kemikaliji, ki so lahko koristne za določitev preskusnih pogojev, so med drugim strukturna formula, sestava v primeru snovi z več sestavinami, UVCB, zmesi ali pripravkov, čistost, topnost v vodi, obstojnost v vodi in na svetlobi, disociacijska konstanta kisline (pK_a), porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}), K_d v usedlino, parni tlak in biološka razgradljivost. Topnost v vodi in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so med preskusnim obdobjem verjetne znatne izgube preskusne kemikalije. Če so verjetne izgube preskusnih kemikalij, jih je treba kvantificirati in dokumentirati nadaljnje ukrepe za nadzorovanje takih izgub. Če so informacije o topnosti in obstojnosti preskusnih kemikalij nejasne, se priporoča, da se te lastnosti ocenijo v pogojih preskusa, tj. v gojišču, pri temperaturi in režimu osvetlitve, ki se bodo uporabili v preskusu. *Opomba*: če se preskušajo herbicidi, ki peroksidirajo in so odvisni od svetlobe, mora uporabljena laboratorijska razsvetljava zagotavljati enako raven sončne ultravijolične svetlobe kot naravna sončna svetloba.

▼M7

10. V preskusnem gojišču je treba meriti vrednost pH in jo po potrebi prilagoditi. Nadzorovanje vrednosti pH preskusnega gojišča je še posebej pomembno na primer pri preskušanju kovin ali kemikalij, ki so hidrolitično neobstojne. Dodatna navodila za preskušanje kemikalij s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki otežujejo njihovo preskušanje, so na voljo v Smernicah OECD (11).

VELJAVNOST PRESKUSA

11. Za veljavnost rezultatov preskusa se morata povprečna skupna dolžina poganjka in povprečna skupna sveža teža poganjka pri kontrolnih rastlinah med fazo izpostavljenosti preskusa vsaj podvojiti. Poleg tega kontrolne rastline ne smejo kazati nobenih vidnih simptomov kloroze in zanje se lahko s prostim očesom oceni, da niso kontaminirane z drugimi organizmi, kot so sloji alg in/ali bakterij na rastlinah, na površini usedline in v preskusnem gojišču.

12. Povprečni koeficient variacije za prirast, ki temelji na meritvah sveže teže poganjka (tj. od začetka do konca preskusa), v kontrolnih kulturah ni večji od 35 % med ponovljenimi vzorci.

REFERENČNA KEMIKALIJA

13. Referenčne kemikalije, kot je na primer 3,5-diklorofenol, uporabljen pri krožnem testu (9), je treba redno preskušati, da se preveri učinkovitost preskusa v daljšem obdobju. Podatki krožnega testa kažejo, da so bila aritmetična povprečja vrednosti EC_{50} 3,5-diklorofenola za različne spremenljivke odziva med 4,7 mg/l in 6,1 mg/l (za podrobne podatke o pričakovanem intervalu zaupanja za navedene vrednosti glej poročilo o krožnem testu). Priporočljivo je, da se referenčna kemikalija preskusi najmanj dvakrat letno oziroma skupaj z dokončnimi preskusi toksičnosti, kadar se preskušanja izvajajo redkeje. Navodila o pričakovanih vrednostih EC_{50} za 3,5-diklorofenol vsebuje statistično poročilo o mednarodnem krožnem testu (9).

OPIS METODE

Preskusna oprema

14. Preskus je treba izvesti v nadzorovanih okoljskih razmerah, tj. v rastni komori, prostoru za rast ali laboratoriju, v katerem se lahko nadzorujejo dolžina dneva, svetloba in temperatura (glej odstavke od 56 do 58 v oddelku „Preskusni pogoji“). Založne kulture je treba vzdrževati ločeno od preskusnih posod.

15. Za študijo je treba uporabiti steklene preskusne posode, kot so akvariji ali čaše, običajno pa se uporabljajo dvolitrske steklene čaše (z višino približno 24 cm in premerom 11 cm). Vendar so lahko primerne tudi druge (tj. večje) posode, če omogočajo, da je vodna gladina dovolj visoko za neomejeno rast in da so rastline med celotnim trajanjem preskusa potopljene.

16. Plastični ali stekleni lončki za rastline (s premerom približno 9 cm, višino 8 cm in prostornino 500 ml) se lahko uporabijo kot posode za sajenje rastlin v usedlino. Lahko se uporabijo tudi steklene čase in so v nekaterih primerih najprimernejša možnost (npr. preskušanje hidrofobnih kemikalij ali kemikalij z visokim K_{ow}).

17. Premisliti je treba o izbiri lončka/čaše in preskusnih posod ter najprimernejšem načrtu preskusa (glej v nadaljevanju). Če se uporabi načrt preskusa A (en poganjek v lončku s tremi lončki na posodo), bodo potrebni manjši lončki ali večje posode. Če se uporabi načrt preskusa B (trije poganjki v lončku in en lonček na posodo), morata biti navedeni lonček in posoda ustrezne velikosti. V vseh primerih mora biti vodna gladina 12 cm nad vrhom usedline, razmerje med površino/prostornino usedline in površino/prostornino vode pa je treba zabeležiti.

▼M7

Preskusni organizem

18. Splošni pristopi, opisani v tej preskusni metodi, se lahko uporabljajo za preskušanje številnih vrst vodnih rastlin. Vendar so pogoji, opisani v tej preskusni metodi, prilagojeni za preskušanje rmanca vrste *Myriophyllum spicatum*. Ta vrsta spada v družino dvokaličnic *Haloragaceae*.

19. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) je potopljena, ukoreninjena vrsta, ki lahko raste v številnih pogojih in tako v statičnih kot tekočih vodnih telesih. Klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) je trajnica, ki med zimo odmre do korenin. Rastline običajno cvetijo in se prosto osemenijo, čeprav je vegetativno razmnoževanje iz pomožnih zarodnih brstičev ali delov stebla, ki se ločijo naravno ali po motnji, pogosto glavna metoda kolonizacije.

Gojenje preskusnega organizma

20. Rastline se lahko pridobijo iz naravnih populacij ali prek dobaviteljev vodnih rastlin. V obeh primerih je treba dokumentirati vir rastlin in preveriti identiteto vrste. Pri nabiranju klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) na terenu je treba zelo paziti, da se pridobi pravilna vrsta, zlasti na območjih, na katerih se lahko križa z drugimi vrstami *Myriophyllum*. V primeru dvoma se priporoča, da se uporabijo preverjene laboratorijske kulture iz znanih virov. Rastline, ki so bile izpostavljene kakršnim koli kemičnim onesnaževalcem ali so bile zbrane na mestih, za katera je znano, da so kontaminirana, se pri tem preskusu ne smejo uporabiti.

21. Na območjih, na katerih klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) ni zlahka dostopen v zimskih mesecih, je treba založne kulture dolgoročno vzdrževati v rastlinjaku ali v laboratorijskih pogojih. Založne kulture je treba vzdrževati v pogojih, ki so podobni preskusnim pogojem, čeprav sta lahko obsevanost in temperatura nižja, da se zmanjša pogostost vzdrževanja kulture (npr. kadar se za določeno obdobje ne načrtujejo preskusi z vrsto *Myriophyllum*). Priporočljivo je, da se uporabijo večji akvariji in lončki za rastline, kot bi se uporabili pri preskusih, da je dovolj prostora za proliferacijo. Sestava gojišča iz usedline in vode mora biti enaka sestavi, ki se uporablja za preskuse, čeprav se lahko uporabijo alternativne metode za gnojenje usedline (npr. uporaba komercialnih pripravkov gnojil s počasnim sproščanjem).

22. Pri rastlinah za založno kulturo se lahko s prostim očesom oceni, da niso kontaminirane z drugimi organizmi, vključno s polži, nitastimi algami, glivami in žuželkami, npr. z jajčeci ali ličinkami dristavčeve vešče *Paraponyx stratiotata* in ličinkami ali odraslimi rmancevimi vodnimi bičkarji *Eubrychius velutus*. Da se odpravi vidna kontaminacija, je treba rastlinski material sprati v sladki vodi. Poleg tega si je treba prizadevati čim bolj zmanjšati razvoj enoceličnih alg in bakterijskih okužb, čeprav ni nujno, da je rastlinski material popolnoma sterilen. Založne kulture je treba spremljati in po potrebi presaditi, da se preprečijo kontaminacija z algami in bakterijske okužbe. Če kontaminacija z algami ali bakterijske okužbe postanejo težava, lahko pomaga prezračevanje založnih kultur.

23. V vseh primerih se rastline ustrezno obdobje (tj. več kot dva tedna) pred uporabo v preskusu gojijo/aklimatizirajo v pogojih, ki so podobni pogojem, ki se uporabljajo pri preskusu, vendar ni nujno, da so enaki.

24. Cvetoče založne kulture se v preskusu ne smejo uporabiti, saj se hitrost vegetativne rasti med cvetenjem in po njem običajno zmanjša.

▼M7

Usedlina

25. Za uporabo v tem preskusu se priporoča uporaba naslednje formulirane usedline, ki temelji na umetni usedlini, uporabljeni v poglavju C.28 te priloge (8). Usedlina se pripravi, kot je opisano v TM C.28, razen dodatka hranilnih snovi, ki se pripravi, kot je opisano v nadaljevanju:

a) 4–5 % šote (suha teža v skladu z 2 % ± 0,5 % organskega ogljika) čim bližje vrednosti pH od 5,5 do 6,0, pomembno pa je, da se uporabi fino mleta šota v prahu (delci naj bodo po možnosti manjši od 1 mm), ki je sušena le na zraku;

b) 20 % (suhe teže) kaolinske gline (vsebnost kaolinita naj bo po možnosti večja od 30 %);

c) 75–76 % (suhe teže) kremenovega peska (prevladovati mora fini pesek, pri katerem je več kot 50 % delcev velikih od 50 μm do 200 μm);

d) doda se vodno hranilno gojišče, tako da končna serija usedline vsebuje 200 mg/kg suhe usedline amonijevega klorida in natrijevega fosfata, odstotek vlage v končni zmesi pa znaša od 30 % do 50 %;

e) doda se kemijsko čist kalcijev karbonat ($CaCO_3$), da se vrednost pH v končni zmesi usedline uravna na 7,0 ± 0,5.

26. Vir šote, kaolinske gline in peska mora biti znan in dokumentiran. Če je izvor neznan ali je lahko razlog za skrb, je treba preveriti, da v zadevnih sestavinah ni kemičnih onesnaževal (npr. težkih kovin, organoklornih spojin in organofosfornih spojin).

27. Suhe sestavine usedline je treba homogeno premešati, preden se v usedlino v celoti vmeša vodna hranilna raztopina. Vlažno usedlino je treba pripraviti vsaj dva dni pred uporabo, da se šota v celoti namoči in da hidrofobni delci šote ne priplavajo na površje, ko je usedlina prekrita z gojiščem, pred uporabo pa se lahko vlažna usedlina hrani v temi.

28. Za preskus se usedlina premesti v posode ustrezne velikosti, kot so lončki za rože takega premera, da se lahko postavijo v steklene posode (površina usedline mora prekrivati približno 70 % ali več površine posode). Če ima posoda na dnu luknje, bo kos filtrirnega papirja na dnu posode pomagal, da usedlina ne bo uhajala iz posode. Lončki se napolnijo z usedlino tako, da je površina usedline ravna, nato pa se prekrijejo s tanko plastjo (~ 2 mm do 3 mm) inertnega materiala, kot je na primer pesek ali fini vrtnarski pesek (ali koralni pesek), da usedlina ne uhaja.

Preskusno gojišče

29. Za gojenje in preskušanje klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) se priporoča gojišče po Smartu in Barku (12). Priprava tega gojišča je opisana v Dodatku 1. Vrednost pH gojišča (vodna faza) na začetku preskusa mora biti med 7,5 in 8,0, da se zagotovi optimalna rast rastlin.

Načrt poskusa

30. Preskus mora vključevati najmanj šest preskusnih posod s ponovljenimi vzorci za netretirano kontrolo in najmanj štiri preskusne posode s ponovljenimi vzorci za vsako od najmanj petih ravni koncentracije.

31. Če ni treba določiti vrednosti NOEC, se načrt preskusa lahko spremeni tako, da se poveča število koncentracij in zmanjša število ponovljenih vzorcev na koncentracijo.

▼M7

32. Vsaka preskusna posoda je ponovljeni vzorec, ki vsebuje tri poganjke. Obstajata dve možnosti za gojenje treh poganjkov v vsaki preskusni posodi:

— Načrt preskusa A: en poganjek v lončku in trije lončki na posodo.

— Načrt preskusa B: trije poganjki v lončku in en lonček na posodo.

— Alternativni načrti preskusa z enim poganjkom v enem lončku na preskusno posodo so sprejemljivi, če se ponovljeni vzorec prilagodi, kot je potrebno za izpolnjevanje zahtevanih meril za veljavnost.

33. Posamezne preskusne posode morajo biti naključno dodeljene tretiranim skupinam. Na preskusnem območju je treba preskusne posode razporediti naključno, da se zmanjša vpliv prostorskih razlik v obsevanosti in temperaturi.

Koncentracije preskusne kemikalije in kontrolne skupine

34. Koncentracije morajo biti običajno razporejene v geometrijske serije, faktor separacije med preskusnimi koncentracijami pa ne sme biti večji od 3,2. Pri izbiri primernih preskusnih koncentracij je v pomoč predhodno poznavanje toksičnosti preskusne kemikalije na podlagi podatkov iz preskusa za določanje območja delovanja.

35. Za določitev EC_x z ustrezno ravnijo zaupanja morajo preskusne koncentracije oklepati vrednost EC_x. Če se na primer ocenjuje EC_{50}, mora biti najvišja preskusna koncentracija višja od vrednosti EC_{50}. Če je vrednost EC_{50} zunaj območja preskusnih koncentracij, bodo povezani intervali zaupanja veliki in pravilna ocena statističnega ujemanja modela morda ne bo mogoča. Z uporabo več preskusnih koncentracij se bo izboljšal interval zaupanja okoli posledične vrednosti EC_x.

36. Za določitev vrednosti LOEC/NOEC (izbirna končna točka) mora biti najmanjša preskusna koncentracija dovolj majhna, da se rast ne razlikuje bistveno od rasti kontrolnih rastlin. Poleg tega mora biti najvišja preskusna koncentracija dovolj visoka, da je rast bistveno manjša od rasti v kontroli. Z uporabo več ponovljenih vzorcev se bo povečala statistična pomembnost koncentracije brez učinka/načrta analize variance.

Mejni preskus

37. Kadar preskus za določanje območja delovanja pokaže, da preskusna kemikalija nima škodljivih učinkov pri koncentracijah do 100 mg/l ali do svoje meje topnosti v preskusnem gojišču ali v primeru pripravka do meje razpršljivosti, se lahko izvede mejni preskus, da se omogoči primerjava odzivov v kontrolni skupini in eni tretirani skupini (100 mg/l ali koncentracija, ki je enaka meji topnosti, ali 1 000 mg/kg suhe usedline). Ta preskus je treba izvesti v skladu s splošnimi načeli standardnega preskusa odziva na odmerek, vendar se priporoča, da se najmanjše število ponovljenih vzorcev poveča na šest preskusnih posod na kontrolo in koncentracijo. Rast v kontrolni in tretirani skupini se lahko analizira s statičnim preskusom za primerjavo povprečij, na primer s Studentovim t-testom.

Testne raztopine

38. Testne raztopine se običajno pripravijo z razredčitvijo osnovne raztopine, ki se pripravi tako, da se preskusna kemikalija raztopi ali razprši v gojišču po Smartu in Barku z demineralizirano (tj. destilirano ali deionizirano) vodo (glej Dodatek 1).

▼M7

39. Najvišja preskusna koncentracija običajno ne sme preseči topnosti preskusne kemikalije v vodi ali v primeru pripravkov razpršljivosti v preskusnih pogojih.

40. Za preskusne kemikalije z majhno topnostjo v vodi bo morda treba pripraviti koncentrirano osnovno raztopino ali dispergirati kemikalijo s pomočjo organskega topila ali disperzijskega sredstva, da se omogoči dodajanje točnih količin preskusne kemikalije v preskusno gojišče ter olajšata njeno dispergiranje in raztapljanje. Čim bolj si je treba prizadevati preprečiti uporabo takih topil ali disperzijskih sredstev. Uporaba pomožnih topil ali disperzijskih sredstev ne sme povzročiti fitotoksičnosti. Pogosto uporabljeni topili, ki ne povzročata fitotoksičnosti pri koncentracijah do 100 µl/l, sta na primer aceton in dimetilformamid. Če se uporabi topilo ali disperzijsko sredstvo, je treba njegovo končno koncentracijo navesti v poročilu in jo ohranjati na najnižji ravni (≤ 100 µl/l). V teh okoliščinah morajo vsa tretiranja in kontrole (s topilom) vsebovati isto koncentracijo topila ali disperzijskega sredstva. Netretirani kontrolni ponovljeni vzorci, ki ne vsebujejo topila ali disperzijskega sredstva, so prav tako vključeni v načrt preskusa. Dodatna navodila o uporabi disperzijskih sredstev so na voljo v Smernicah OECD (11).

PRESKUSNI POSTOPEK

41. Preskusni postopek se razlikuje glede na način dodajanja preskusne kemikalije (tj. prek vodne faze ali faze usedline). Upoštevati je treba verjetno obnašanje preskusne kemikalije v sistemu vode in usedline, da se na podlagi teh podatkov izbere režim izpostavljenosti, uporabljen pri preskusu (tj. statični preskus ali statična zamenjava, voda s primešano preskusno snovjo ali usedlina s primešano preskusno snovjo). Preskusi z usedlino s primešano preskusno snovjo so v nekaterih primerih najprimernejša možnost za kemikalije, ki naj bi imele znatno porazdelitev v usedlino.

Faza vzpostavitve

42. Zdravi vršički/konci poganjka, tj. brez stranskih poganjkov, se odrežejo od rastlin iz kulture, da je poganjek dolg 6 cm (± 1 cm). Pri načrtu preskusa A (en poganjek v lončku in trije lončki na posodo) se v vsak lonček posadi en konec poganjka. Pri načrtu preskusa B (trije poganjki v lončku in en lonček na posodo) se v lonček, ki vsebuje usedlino, posadi pet vršičkov poganjkov.

43. V obeh primerih je treba rastline posaditi v dodatne lončke, da se lahko na začetku preskusa izberejo enotne rastline ter zagotovijo nadomestne rastline, ki se uporabijo za preverjanje rasti korenin takoj pred tretiranjem, in nadomestne rastline, ki se požanjejo za meritve biomase in dolžine poganjka na dan 0.

44. Poganjki se posadijo tako, da usedlina prekriva vsaj tri centimetre poganjkov, ki zajemajo vsaj dve kolenci.

45. Lončki se nato prestavijo v preskusne posode v enakih okoljskih razmerah kot pri fazi izpostavljenosti ter vzdržujejo sedem dni v gojišču po Smartu in Barku, da se inducira razvoj korenin.

46. Potem je treba več rastlin v nadomestnih lončkih odstraniti, da se preveri rast korenin. Če rast korenin ni vidna (tj. konci korenin niso vidni), je treba fazo vzpostavitve podaljšati za toliko, da je vidna rast korenin. Priporoča se, da se ta korak izvede za zagotovitev, da rastline aktivno rastejo na začetku preskusa.

▼M7

Izbira enotnega rastlinskega materiala

47. Pri načrtu preskusa A (en poganjek v lončku in trije lončki na posodo) se pred začetkom preskusa lončki izberejo tako, da se zagotovi enotnost. Pri načrtu preskusa B (trije poganjki v lončku in en lonček na posodo) se odvečne rastline odstranijo, da ostanejo tri rastline enotne velikosti in videza.

Izpostavljenost prek vodne faze

48. Lončki, izbrani zaradi enotnosti, se prestavijo v preskusne posode v skladu z načrtom poskusa. Nato se v preskusne posode doda gojišče po Smartu in Barku. Pri tem je treba paziti, da se v čim večji meri prepreči dvigovanje usedline. Za ta namen se lahko gojišče doda z lijem ali pa se usedlina prekrije s plastičnim pokrovom, medtem ko se gojišče doliva v preskusne posode, če se pokrov nato takoj odstrani. Lončki za rastline se lahko v preskusne posode dodajo tudi potem, ko se doda gojišče. V obeh primerih se lahko na začetku faze izpostavljenosti uporabi sveže gojišče, če je to potrebno, da se čim bolj zmanjša možnost kopičenja alg in bakterij ali da se omogoči priprava ene serije testne raztopine za vse ponovljene vzorce.

49. Pred dodajanjem gojišča ali po njem se izmeri dolžina poganjka nad usedlino.

50. Preden se preskusno gojišče doda v preskusne posode, se mu lahko dodajo ustrezne količine preskusne kemikalije. Preskusna kemikalija se lahko gojišču doda tudi potem, ko je že bilo dodano v preskusne posode. V tem primeru je treba paziti, da se preskusna kemikalija homogeno porazdeli po celotnem preskusnem sistemu, ne da bi pri se pri tem dvigovala usedlina.

51. V vseh primerih se na začetku preskusa zabeleži videz preskusnega gojišča (npr. prozorno, motno gojišče itd.).

Izpostavljenost prek usedline

52. Usedline s primešano preskusno snovjo izbrane koncentracije se pripravijo z dodajanjem raztopine preskusne kemikalije neposredno v svežo usedlino. Osnovna raztopina preskusne kemikalije, raztopljene v deionizirani vodi, se zmeša s formulirano usedlino z valjčnim mlinom, mešalnikom za krmo ali ročno. Če je preskusna kemikalija slabo topna v vodi, se lahko raztopi v čim manjši količini ustreznega organskega topila (npr. heksana, acetona ali kloroforma). Ta raztopina se nato zmeša s približno 10 g finega kremenovega peska na eno preskusno posodo. Topilo naj izhlapi in pesek se nato zmeša z ustrezno količino usedline na preskusno čašo. Za raztapljanje, razpršitev ali emulgiranje preskusne kemikalije se lahko uporabijo samo sredstva, ki hitro izhlapijo. Ne smemo pozabiti, da je treba pri končni pripravi usedline upoštevati količino/težo peska s primešano preskusno kemikalijo (tj. usedlino je torej treba pripraviti z manj peska). Paziti je treba, da je preskusna kemikalija, ki se doda usedlini, v njej temeljito in enakomerno razporejena.

53. Z usedlino s primešano preskusno snovjo se napolnijo lončki (kot je opisano zgoraj). Rastline, izbrane zaradi enotnosti in ustreznega koreninskega sistema, se odstranijo iz lončkov, ki so se uporabljali med fazo vzpostavitve, in presadijo v usedlino s preskusno snovjo, kot je opisano zgoraj.

54. Lončki se prestavijo v preskusne posode v skladu z načrtom poskusa. Nato se previdno doda gojišče po Smartu in Barku (tj. z uporabo lijaka), da se prepreči dvigovanje usedline. Pred dodajanjem gojišč ali po njem se izmeri dolžina poganjka nad usedlino.

▼M7

Vzdrževanje nivoja vode med preskusom

55. Zabeležiti je treba končno količino vode in nivo vode, ki je označen na vsaki preskusni posodi. Če med preskusom izhlapi več kot 10 % vode, je treba nivo vode uravnati z destilirano vodo. Po potrebi se lahko čaše ohlapno prekrijejo s prozornim pokrovom, kot so prozorni plastični pokrovi, da se zmanjšata izhlapevanje in kontaminacija s trosi alg.

Preskusni pogoji

56. Uporabiti je treba toplo in/ali hladno belo fluorescenčno osvetlitev, da se zagotovi obsevanost s svetlobo v območju približno 140 (± 20) μE m^{-2} s^{-1}, ko se meri kot fotosintetsko aktivno sevanje (400–700 nm) na vodni površini, in cikel svetlobe in teme v razmerju 16: 8 ur. Morebitne razlike v izbrani obsevanosti s svetlobo na preskusnem območju ne smejo biti večje od ± 15 %.

57. Temperatura preskusnih posod mora biti 20 °C ± 2°C.

58. Vrednost pH kontrolnega gojišča se med preskusom ne sme povečati za več kot 1,5 enote. Vendar odstopanje za več kot 1,5 enote ne pomeni razveljavitve preskusa, če se lahko dokaže, da so izpolnjena zgoraj navedena merila za veljavnost.

Trajanje preskusa

59. Obdobje izpostavljenosti traja 14 dni.

Meritve in analitske določitve

60. Po fazi vzpostavitve in takoj pred tretiranjem (tj. na dan 0) se požanjejo nadomestne rastline iz petih naključno izbranih lončkov za načrt s tremi rastlinami v lončku ali petnajstih lončkov za načrt z eno rastlino v lončku za oceno dolžine, sveže teže in suhe teže poganjka, kot je opisano v nadaljevanju.

61. Pri rastlinah, prenesenih v fazo izpostavljenosti, je treba opraviti naslednje ocene, kot je prikazano v preglednici 1:

— ocene dolžine glavnega poganjka, števila stranskih poganjkov in dolžine stranskih poganjkov se zabeležijo vsaj na koncu obdobja izpostavljenosti (npr. na dan 14);

— vizualne ocene zdravja rastlin se zabeležijo vsaj trikrat med obdobjem izpostavljenosti (npr. na dneve 0, 7 in 14);

— ocene sveže teže in suhe teže poganjka se opravijo na koncu preskusa (tj. na dan 14).

62. Dolžina poganjka se izmeri z ravnilom. Če obstajajo stranski poganjki, jih je treba prešteti in izmeriti tudi njihovo dolžino.

63. Vizualne ocene zdravja rastlin je treba opraviti tako, da se zabeleži videz rastlin in splošno stanje preskusnega gojišča. Zabeležiti je treba med drugim naslednja opažanja:

— nekrozo, klorozo ali drugo razbarvanje, kot je prekomerna pordečitev glede na kontrolne rastline;

— razvoj bakterijskih okužb ali kontaminacijo z algami;

— anomalije pri rasti, kot so pritlikavost, spremenjena dolžina med kolenci, deformirani poganjki/listi, proliferacija stranskih poganjkov, odpadanje listov, upad pritiska celične vsebine na celične stene in fragmentacija stebla;

▼M7

— vizualna ocena zdravja korenin se opravi na koncu preskusa, tako da se usedlina previdno spere s korenin in s tem omogoči opazovanje koreninskega sistema. Predlagana lestvica za oceno glede na kontrolne rastline je prikazana v nadaljevanju:

1) odsotnost korenin,

2) nekaj korenin,

3) zmeren razvoj korenin,

4) zelo dober razvoj korenin, podoben kontrolam.

64. Ocene sveže teže se opravijo na začetku in na koncu preskusa, tako da se poganjek odreže na ravni usedline, nato pa se pred tehtanjem z njega popivna voda do suhega. Paziti je treba, da se odstranijo delci usedline, ki se lahko prilepijo na dno poganjka. Material poganjka se nato postavi v sušilnik s temperaturo približno 60 °C in suši do konstantne teže, preden se ponovno stehta in zabeleži suha teža.

65. V preglednici 1 so povzete minimalne biološke ocene, ki jih je treba opraviti med trajanjem preskusa.

Preglednica 1

Časovni načrt ocenjevanja

Dan po tretiranju	*Klasasti rmanec (Myriophyllum spicatum)*			
	dolžina poganjka, dolžina in število stranskih poganjkov	vizualna ocena poganjkov	sveža in suha teža poganjka, vizualna ocena korenin	pH O_2
0	O	O	O	O
4	—	—	—	—
7	—	O	—	O
14	O	O	O	O

O: pomeni, da je ob tem času potrebno ocenjevanje.
—: pomeni, da meritve niso potrebne.

Pogostost meritev in analitskih določitev

66. Najmanj dnevno (ali stalno z zapisovalnikom podatkov) je treba beležiti temperaturo gojišča v nadomestni posodi, ki je pod enakimi pogoji v rastni komori, inkubatorju ali prostoru.

67. Vrednost pH in koncentracijo raztopljenega kisika v preskusnem gojišču je treba v vseh posodah s ponovljenimi vzorci preveriti na začetku preskusa, vsaj enkrat med študijo in na koncu preskusa. Vsakič je treba meritve opraviti ob istem času. Če se za pripravo vseh ponovljenih vzorcev pri vsaki preskusni koncentraciji uporabijo nepakirane raztopine, je na dan 0 sprejemljiva ena meritev vsake nepakirane raztopine.

68. Obsevanost je treba meriti v rastni komori, inkubatorju ali prostoru na točkah, ki so enake ravni vodne gladine. Meritve je treba opraviti vsaj enkrat na začetku preskusa ali med preskusom. Metoda zaznavanja in merjenja svetlobe, zlasti vrsta tipala, vpliva na izmerjeno vrednost. Sferična tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad in pod ravnino merjenja) in

▼M7

„kosinusna“ tipala (ki se odzivajo na svetlobo iz vseh kotov nad ravnino merjenja) so primernejša od enosmernih tipal in omogočajo višje odčitke v primeru večtočkovnih svetlobnih virov vrste, ki je opisana tu.

Analitske meritve preskusne kemikalije

69. Pravilna uporaba preskusne kemikalije mora biti podprta z analitskimi meritvami koncentracij preskusne kemikalije.

70. Vzorce vode za analizo preskusne kemikalije je treba za vse preskusne koncentracije zbrati takoj po začetku preskusa (tj. na dan dodajanja pri obstojnih preskusnih kemikalijah ali eno uro po dodajanju pri neobstojnih kemikalijah) in ob zaključku preskusa.

71. Koncentracije v usedlini in porni vodi usedline je treba določiti na začetku in na koncu preskusa vsaj pri najvišji preskusni koncentraciji, razen če je za preskusne kemikalije znano, da so obstojne v vodi (> 80 % nominalne vrednosti). Meritve v usedlini in porni vodi morda ne bodo potrebne, če je bila porazdelitev preskusne kemikalije med vodo in usedlino jasno določena v študiji vode/usedline v primerljivih pogojih (npr. razmerje med usedlino in vodo, metoda dodajanja, vrsta usedline).

72. Vzorčenje usedline na začetku preskusa bo najverjetneje motilo preskusni sistem. Zato so lahko potrebne dodatne tretirane preskusne posode, da se omogočijo analitske določitve na začetku in na koncu preskusa. Če se oceni, da so potrebne vmesne ocene, tj. na dan 7, in so za analize potrebni veliki vzorci usedline, ki jih ni mogoče zlahka odstraniti iz preskusnega sistema, je treba analitsko določanje podobno opraviti z uporabo dodatnih preskusnih posod, ki so tretirane na isti način kot posode, ki se uporabljajo za biološke ocene.

73. Za izolacijo intersticijske vode se na primer priporoča 30-minutno centrifugiranje pri 10 000 g in 4 °C. Če pa se za preskusno kemikalijo dokaže, da se ne adsorbira v filtre, je sprejemljivo tudi filtriranje. V nekaterih primerih koncentracij v porni vodi zaradi premajhne velikosti vzorca morda ne bo mogoče analizirati.

74. Pri polstatičnih preskusih (tj. izpostavljenost prek vodne faze), pri katerih se ne pričakuje, da bo koncentracija ustreznih preskusnih kemikalij med trajanjem preskusa ostala v območju 20 % nominalne koncentracije brez zamenjave testnih raztopin, je treba vzorčiti uporabljene in sveže pripravljene testne raztopine za analizo koncentracije preskusne kemikalije ob vsaki zamenjavi.

75. Kadar izmerjena začetna koncentracija preskusne kemikalije ni v območju 20 % nominalne koncentracije, vendar obstajajo zadostni dokazi, da so začetne koncentracije ponovljive in obstojne (tj. v območju 80–120 % začetne koncentracije), se lahko kemijske določitve opravijo le pri najvišji in najnižji preskusni koncentraciji.

76. V vseh primerih je treba izvesti določanje koncentracij preskusne kemikalije samo na eni posodi s ponovljenim vzorcem pri vsaki preskusni koncentraciji. Alternativno se lahko testne raztopine vseh ponovljenih vzorcev za vsako koncentracijo združijo za analize.

77. Če obstajajo dokazi, da se je koncentracija preskusne kemikalije ohranjala v območju 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije med celotnim preskusom, lahko analiza rezultatov in posledična izpeljava končnih točk temeljita na nominalnih ali izmerjenih začetnih vrednostih.

▼M7

78. V teh primerih morajo učinkovite koncentracije temeljiti na nominalnih ali izmerjenih koncentracijah vode na začetku preskusa.

79. Če pa obstajajo dokazi, da se je koncentracija zmanjšala med preskusom (tj. se ni ohranjala v območju 20 % nominalne ali izmerjene začetne koncentracije v tretiranem oddelku), mora analiza rezultatov temeljiti na geometrijski srednji koncentraciji med izpostavljenostjo ali modelih, ki opisujejo zmanjšanje koncentracije preskusne kemikalije v tretiranem oddelku (11).

OVREDNOTENJE PODATKOV

80. Če je treba uporabiti topilo/disperzijsko sredstvo, se lahko podatki iz kontrol s topilom in netretiranih kontrol združijo za namene statističnih analiz, če se odzivi kontrol s topilom in netretiranih kontrol statistično značilno ne razlikujejo.

Spremenljivke odziva

81. Namen preskusa je z uporabo dveh spremenljivk odziva, in sicer povprečne specifične hitrosti rasti in prirasta, ugotoviti, kakšne učinke ima preskusna kemikalija na vegetativno rast preskusne vrste v skladu z naslednjimi postopki:

Povprečna specifična hitrost rasti

82. Ta spremenljivka odziva temelji na spremembah logaritmov skupne dolžine poganjka, skupne sveže teže poganjka in skupne suhe teže poganjka v časovnem obdobju v kontrolah in vsaki tretirani skupini. Ta spremenljivka se izračuna za vsak ponovljeni vzorec vsake kontrolne in tretirane skupine. Povprečno dolžino in težo treh rastlin na preskusno posodo (ponovljeni vzorec) ter posledično hitrost rasti za vsak ponovljeni vzorec je treba izračunati po naslednji enačbi:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemer je:

μ_{i-j}: povprečna specifična hitrost rasti od časa i do časa j,

N_i: merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času i,

N_j: merjena spremenljivka v preskusni posodi ali kontrolni posodi ob času j,

t: časovno obdobje od i do j.

83. Na podlagi odzivov ponovljenih vzorcev je treba za vsako tretirano in kontrolno skupino izračunati aritmetično povprečje hitrosti rasti in oceniti varianco.

84. Povprečna specifična hitrost rasti se izračuna za celotno preskusno obdobje (čas „i“ v zgornji enačbi pomeni začetek preskusa, čas „j“ pa konec preskusa). Za vsako preskusno koncentracijo in kontrolo se izračuna aritmetično povprečje specifične hitrosti rasti in oceni varianca.

▼M7

85. Nato se lahko za vsako preskusno koncentracijo (tretirano skupino) izračuna odstotek zaviranja hitrosti rasti (I_r) po naslednji enačbi:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

pri čemer je:

% Ir: odstotek zaviranja povprečne specifične hitrosti rasti,

μC: aritmetično povprečje za μ v kontrolni skupini,

μT: aritmetično povprečje za μ v tretirani skupini.

Prirast

86. Ta spremenljivka odziva temelji na spremembah skupne dolžine poganjka, skupne sveže teže poganjka in skupne suhe teže poganjka v časovnem obdobju v kontrolah in vsaki tretirani skupini. Povprečen odstotek zaviranja prirasta (% Iy) se lahko za vsako tretirano skupino izračuna po naslednji enačbi:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

pri čemer je:

% I_y: odstotek zmanjšanja prirasta,

b_C: končna biomasa minus začetna biomasa v kontrolni skupini,

b_T: končna biomasa minus začetna biomasa v tretirani skupini.

Izdelava krivulj koncentracija–odziv

87. Izrisati je treba krivulje koncentracija–odziv, ki prikazujejo povprečen odstotek zaviranja spremenljivke odziva (I_r ali I_y), ki se izračuna, kot je prikazano zgoraj, in krivuljo logaritemsko transformirane koncentracije preskusne kemikalije.

Ocena vrednosti EC_x

88. Ocene vrednosti EC_x (npr. EC_{50}) morajo temeljiti na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x) in prirastu (E_yC_x), vsaka od teh vrednosti pa temelji na skupni sveži teži poganjka, skupni suhi teži poganjka in skupni dolžini poganjka.

89. Opozoriti je treba, da vrednosti EC_x, izračunane na podlagi teh dveh spremenljivk odziva, niso primerljive, to razliko pa je treba upoštevati pri uporabi rezultatov preskusa. Če se upoštevajo preskusni pogoji iz te preskusne metode, bodo vrednosti EC_x, ki temeljijo na povprečni specifični hitrosti rasti (E_rC_x), v večini primerov višje od rezultatov, ki temeljijo na prirastu (E_yC_x) zaradi matematične osnove teh dveh pristopov. Ta razlika se ne sme razlagati kot razlika v občutljivosti obeh spremenljivk odziva, saj enostavno izvira iz različne matematične narave vrednosti.

Statistični postopki

90. Cilj je kvantificirati odziv na koncentracijo z regresijsko analizo. Po linearni transformaciji podatkov o odzivu se lahko uporabi tehtana linearna regresija, na primer v probit ali logaritemskih ali Weibullovih enotah (13), vendar so nelinearni regresijski postopki prednostne tehnike, ki bolje obravnavajo neizogibne nepravilnosti in odstopanja podatkov od enakomerne porazdelitve. Če se te nepravilnosti približujejo ničelnemu ali popolnemu zaviranju, se lahko s transformacijo povečajo in ovirajo analizo (13). Opozoriti je treba, da

▼M7

so standardne metode probit analize, logaritemske analize ali Weibullove transformacije namenjene uporabi pri kvantnih podatkih (npr. za umrljivost ali preživetje), zato jih je treba prilagoditi za uporabo na podatkih o hitrosti rasti ali prirastu. Specifični postopki za določanje vrednosti EC_x iz stalnih podatkov so na voljo v (14), (15), (16) in (17).

91. Za vsako spremenljivko odziva, ki se bo analizirala, se izračuna točkovna ocena vrednosti EC_x, pri čemer se uporabi razmerje med odzivom in koncentracijo. Določijo se 95-odstotne meje zaupanja za vsako oceno in grafično ali statistično je treba oceniti, kako se podatki o odzivu prilegajo regresijskemu modelu. Regresijsko analizo je treba opraviti na odzivih posameznih ponovljenih vzorcev in ne na povprečjih tretiranih skupin.

92. Ocene EC_{50} in meje zaupanja se lahko pridobijo tudi z linearno interpolacijo s samovzorčenjem (18), če razpoložljivi regresijski modeli/metode niso primerni za podatke.

93. Za oceno vrednosti LOEC in s tem tudi vrednosti NOEC je treba primerjati povprečja tretiranih skupin s tehnikami analize variance (ANOVA). Povprečje za vsako koncentracijo se z uporabo primerne preskusne metode (npr. z Dunnettovim ali Williamsovim testom) nato primerja s srednjo vrednostjo kontrole (19) (20) (21) (22). Oceniti je treba, ali veljata predpostavki normalne porazdelitve in homogenosti varianc v analizi variance. To oceno je treba izvesti s Shapiro-Wilkovim testom (normalna porazdelitev) ali Levenejevim testom (homogenost varianc). Če predpostavki normalne porazdelitve in homogenosti varianc nista izpolnjeni, se lahko ponekod to popravi z logaritemsko transformacijo podatkov. Če sta heterogenost variance in/ali odstopanje od normalne porazdelitve izredno velika in ju ni mogoče odpraviti s transformacijo, je treba proučiti možnosti analize z metodami, kot sta Bonferronijev-Welchev t-test, Bonferronijev test mediane ter test po Jonckheere-Terpstraju. Dodatna navodila o določanju vrednosti NOEC so na voljo v (16).

POROČANJE

94. V poročilu o preskusu je treba navesti naslednje informacije:

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusne vrste

— Znanstveno ime in vir.

Preskusni pogoji

— Trajanje in pogoji faze vzpostavitve.

— Uporabljeni preskusni postopek (statični, polstatični, pulzirajoči).

▼M7

— Datum začetka preskusa in njegovo trajanje.

— Preskusno gojišče, tj. usedlina in tekoče hranilno gojišče.

— Opis načrta poskusa: rastna komora/prostor ali laboratorij, preskusne posode in pokrovi, količine raztopin, dolžina in teža preskusnih rastlin na preskusno posodo na začetku preskusa, razmerje med površino usedline in vodno gladino, razmerje med usedlino in količino vode.

— Preskusne koncentracije (nominalne in izmerjene, kot je ustrezno) in število ponovljenih vzorcev za posamezno koncentracijo.

— Metode priprave osnovnih in testnih raztopin, vključno z uporabo kakršnih kolih topil ali disperzijskih sredstev.

— Temperatura med preskusom.

— Svetlobni vir, obsevanost ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$).

— Vrednosti pH preskusnega in kontrolnega gojišča ter videz preskusnega gojišča na začetku in na koncu preskusa.

— Koncentracije kisika.

— Metoda analize z ustreznimi podatki za oceno kakovosti (validacijske študije, standardni odkloni ali meje zaupanja analiz).

— Metode za določanje merjenih spremenljivk, npr. dolžine, suhe teže in sveže teže.

— Vsa odstopanja od te preskusne metode.

Rezultati

— Neobdelani podatki: dolžina poganjka in teža poganjka rastlin/lončka ter druge merjene spremenljivke za vsako preskusno in kontrolno posodo ob vsakem opazovanju in analizi v skladu s časovnim načrtom iz preglednice 1.

— Povprečja in standardni odkloni za vsako merjeno spremenljivko.

— Krivulje rasti za vsako koncentracijo.

— Podvojitveni čas/hitrost rasti v kontroli na podlagi dolžine in sveže teže poganjka, vključno s koeficienti variacije za prirast sveže teže.

— Izračunane spremenljivke odziva za vsak tretirani ponovljeni vzorec s povprečji in koeficientom variacije za ponovljene vzorce.

— Grafična predstavitev razmerja med koncentracijo in učinkom.

— Ocene toksičnih končnih točk za spremenljivke odziva, npr. EC_{50}, in povezani intervali zaupanja. Vrednosti LOEC in/ali NOEC, če sta izračunani, in statistične metode za njuno določitev.

— Če je bila uporabljena analiza variance, velikost opaženega učinka (npr. najmanjša značilna razlika).

— Vsaka stimulacija rasti, opažena pri katerem koli tretiranju.

▼M7

— Kakršni koli vidni znaki fitotoksičnosti ter opažanja testnih raztopin.

— Razprava o rezultatih, vključno z vsemi vplivi na rezultat preskusa, ki izhajajo iz odstopanj od te preskusne metode.

VIRI

(1) Poglavje C.26 te priloge: Preskus zaviranja rasti Lemna sp.

(2) Poglavje C.3 te priloge: Sladkovodne alge in cianobakterije, preskus zaviranja rasti.

(3) Maltby, L. et al. (2010). Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008). Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, zv. 153, str. 199–206.

(5) ISO 16191:2013. Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006). Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, zv. 62/8, str. 715–722.

(7) Poglavje C.50 te priloge: Preskus toksičnosti za klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) brez usedline

(8) Poglavje C.28 te priloge: Preskus strupenosti s trzačami v sistemu vode in usedline z uporabo vode s primešano preskusno snovjo

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014). „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 206, OECD Publishing, Pariz.

(10) Davies, J. et al. (2003). Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, zv. 59/2, str. 231–237.

(11) OECD (2000). „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 23, OECD Publishing, Pariz.

(12) Smart, R. M., J. W. Barko (1985). Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, zv. 21/3, str. 251–263.

(13) Christensen, E. R., N. Nyholm (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, zv. 18/9, str. 713–718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, zv. 11/2, str. 157–167.

(15) Bruce, R. D., D. J. Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, zv. 11/10, 1485–1494.

(16) OECD (2006). „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, št. 54, OECD Publishing, Pariz.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, zv. 29/2, str. 93–96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, zv. 50/272, str. 1096–1121.

(20) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, zv. 20/3, str. 482-491.

(21) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, zv. 27/1, str. 103–117.

(22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, zv. 28/2, str. 519–531.

▼**M7**

Dodatek 1

SESTAVA GOJIŠČA PO SMARTU IN BARKU

Sestavina	Količina reagenta, dodana v vodo (*) (v mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (ravnovesje v zraku)	7,9

(*) Demineralizirana (tj. destilirana ali deionizirana) voda

▼M7

Dodatek 2

OPREDELITEV POJMOV

Biomasa je sveža in/ali suha teža žive snovi, prisotne v populaciji. Pri tem preskusu je biomasa vsota glavnega poganjka, vseh stranskih vej in vseh korenin.

Kemikalija je snov ali zmes.

Kloroza je sprememba barve preskusnega organizma, zlasti spiralasto razvrščenih listov, z zelene na rumenkasto.

ECx je koncentracija preskusne kemikalije, raztopljene v preskusnem gojišču, ki povzroči x-odstotno (npr. 50-odstotno) zmanjšanje rasti klasastega rmanca (*Myriophyllum spicatum*) v ustreznem obdobju izpostavljenosti (navesti v primeru odstopanja od polnega ali običajnega trajanja preskusa). Za nedvoumno označitev vrednosti EC, pridobljene iz hitrosti rasti ali prirasta, se simbol „E_rC“ uporablja za hitrost rasti in simbol „E_yC“ za prirast, sledi pa uporabljena merjena spremenljivka, npr. E_rC (dolžina glavnega poganjka).

Rast je povečanje merjene spremenljivke, npr. dolžine glavnega poganjka, skupne dolžine stranskih vej, skupne dolžine poganjka, skupne dolžine korenine, sveže teže, suhe teže ali števila spiralasto razvrščenih listov, med preskusnim obdobjem.

Hitrost rasti (povprečna specifična hitrost rasti) je logaritemsko povečanje merjene spremenljivke v obdobju izpostavljenosti. *Opomba*: spremenljivke odziva, povezane s hitrostjo rasti, niso odvisne od trajanja preskusa, če je vzorec rasti neizpostavljenih kontrolnih organizmov eksponenten.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) je najnižja preskušena koncentracija, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek na rast (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo v navedenem obdobju izpostavljenosti. Vendar bi morale imeti vse koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC).

Merjene spremenljivke so vse vrste spremenljivk, ki se merijo, da se izrazi končna točka preskusa z eno ali več različnimi spremenljivkami odziva. Pri tej preskusni metodi so merjene spremenljivke dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina stranskih vej, skupna dolžina poganjka, skupna dolžina korenine, sveža teža, suha teža in število spiralasto razvrščenih listov.

Monokultura je kultura z eno rastlinsko vrsto.

Nekroza je mrtvo (tj. belo ali temno rjavo) tkivo preskusnega organizma.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC.

Spremenljivka odziva je spremenljivka za oceno toksičnosti, izpeljana iz katerih koli izmerjenih parametrov, ki opisujejo biomaso, z drugačnim postopkom izračuna. Pri tej preskusni metodi sta hitrost rasti in prirast spremenljivki odziva, izpeljani iz merjenih spremenljivk, kot so dolžina glavnega poganjka, skupna dolžina poganjka, sveža teža, suha teža ali število spiralasto razvrščenih listov.

Polstatični preskus (zamenjava) je preskus, pri katerem se testna raztopina v določenih časovnih presledkih redno menja med preskusom.

▼M7

Statični preskus je preskusna metoda, pri kateri se testna raztopina med preskusom ne zamenja.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Končna točka preskusa opisuje splošen dejavnik, ki ga preskusna kemikalija spremeni glede na kontrolni vzorec in je cilj preskusa. V tej preskusni metodi je končna točka zaviranje rasti, ki ga lahko izrazimo z različnimi spremenljivkami odziva, ki temeljijo na eni ali več merjenih spremenljivkah.

Preskusno gojišče je popolnoma sintetično gojišče, na katerem preskusne rastline rastejo ob izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Običajno se preskusna kemikalija raztopi v preskusnem gojišču.

UVCB je snov z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkt ali biološki material.

Prirast je vrednost merjene spremenljivke za izražanje biomase na koncu obdobja izpostavljenosti, od česar se odšteje vrednost merjene spremenljivke na začetku obdobja izpostavljenosti. Opomba: Če je vzorec rasti neizpostavljenih organizmov eksponenten, se bodo spremenljivke odziva, ki temeljijo na prirastu zmanjševale, ko se bo čas trajanja preskusa povečeval.

▼M8

C.52 RAZŠIRJENI ENOGENERACIJSKI PRESKUS RAZMNOŽEVANJA MEDAKE (MEOGRT)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 240 (2015). Razširjeni enogeneracijski preskus razmnoževanja medake (Medaka Extended One Generation Test, MEOGRT) opisuje izčrpno preskusno metodo, temelječo na ribah, izpostavljenih v več generacijah, za pridobitev podatkov, pomembnih za ekološko nevarnost in oceno tveganja kemikalij, vključno z domnevnimi endokrinimi motilci (endocrine disrupting chemicals, EDC). Izpostavljenost pri preskusu MEOGRT traja do izvalitve (do dveh tednov po oploditvi, tpo) v drugi generaciji (F2). Za utemeljitev koristnosti razširitve generacije F2 na čas po izvalitvi bi bile potrebne dodatne raziskave; trenutno pa ni dovolj informacij za zagotovitev ustreznih pogojev ali meril za utemeljitev razširitve generacije F2. Ta preskusna metoda bo sicer lahko posodobljena, ko se bodo upoštevale nove informacije in podatki. Na primer smernice o razširitvi generacije F2, tako da bi bilo vključeno razmnoževanje, bodo lahko koristne v nekaterih okoliščinah (npr. pri kemikalijah z velikim biokoncentracijskim potencialom ali znakih čezgeneracijskih učinkov pri drugih taksonih). Ta preskusna metoda se lahko uporabi za oceno morebitnih kroničnih učinkov kemikalij, vključno s potencialnimi endokrinimi motilci, na ribe. Glavni poudarek te metode je na morebitnih učinkih, pomembnih za populacijo (tj. škodljivih učinkih na preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje), za izračun koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) ali učinkovite koncentracije (ECx), čeprav je treba navesti, da so pristopi z ECx redko primerni za tovrstne velike študije, pri katerih bo morda povečanje števila preskusnih koncentracij, da bi se omogočila določitev želene ECx, neizvedljivo in lahko tudi povzroči precejšnje pomisleke glede dobrobiti živali zaradi velikega števila uporabljenih živalih. Za kemikalije, pri katerih ni potrebna ocena v „več generacijah“, ali kemikalije, ki niso potencialni endokrini motilci, bodo morda ustreznejše druge preskusne metode (1). Ustrezna vrsta za uporabo v tej preskusni metodi je japonska medaka zaradi kratkega življenjskega cikla in možnosti določitve njenega genetskega spola (2), ki se v tej preskusni metodi šteje za kritično komponento. Posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno navedene pri tej metodi, se uporabljajo samo za japonsko medako. Podobnemu preskusnemu protokolu se lahko prilagodijo druge vrste majhnih rib (npr. cebrica).

2. S to preskusno metodo se meri več bioloških končnih točk. Prvotni poudarek je na morebitnih škodljivih učinkih na parametre, pomembne za populacijo, ki vključujejo preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje. Drugič, da se zagotovijo mehanistični podatki in povezava z rezultati iz drugih vrst terenskih in laboratorijskih študij, kadar obstajajo naknadni dokazi, da je kemikalija potencialni endokrini motilec (npr. androgeno ali estrogeno delovanje iz drugih preskusov in poskusov), se druge koristne informacije pridobijo z merjenjem mRNK *vitelogenina* (*vtg)* (ali proteina vitelogenin, VTG), fenotipskih sekundarnih spolnih značilnosti (SSZ), kot so povezane z genetskim spolom, in histopatološko oceno. Opozoriti je treba, da če za preskusno kemikalijo ali njene metabolite ne obstaja sum, da so EDC, morda ne bo treba izmeriti teh sekundarnih končnih točk, zato bodo morda primernejše študije, za katere bo potrebnih manj virov in manj živali (1). Pojmi, uporabljeni v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

▼M8

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Zaradi omejenega števila preskušenih kemikalij in laboratorijev, vključenih v validacijo tega razmeroma kompleksnega preskusa, se predvideva, da bo preskusna metoda pregledana in po potrebi spremenjena glede na pridobljene izkušnje, ko bo na voljo zadostno število študij za potrditev učinka tega novega koncepta študije. Podatki se lahko uporabijo na ravni 5 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters) (3). Preskusna metoda se začne z izpostavitvijo odraslih rib (generacija F0) preskusni kemikaliji v fazi razmnoževanja. Izpostavljenost se nadaljuje med razvojem in razmnoževanjem v generaciji F1 in izvalitvijo v generaciji F2; preskus tako omogoča oceno strukturnih in aktivacijskih endokrinih poti. Pri razlagi končnih točk, povezanih z endokrinim sistemom, se lahko uporabi pristop, ki temelji na zanesljivosti dokazov.

4. V preskus mora biti vključeno zadostno število osebkov, da se zagotovi zadostna moč za oceno končnih točk, pomembnih za razmnoževanje (glej Dodatek 3), obenem pa je treba poskrbeti, da je zaradi dobrobiti živali uporabljeno najmanjše potrebno število živali. Glede na veliko število uporabljenih preskusnih živali je pomembno, da se skrbno presodi potreba po preskusu glede na obstoječe podatke, ki že lahko vsebujejo ustrezne informacije o številnih končnih točkah preskusa MEOGRT. Določeno pomoč v zvezi s tem je mogoče najti v okviru OECD za preskušanje toksičnosti za ribe (OECD Fish Toxicity Testing Framework) (1).

5. Preskusna metoda je bila oblikovana predvsem za prepoznavanje učinkov posamezne snovi. Če pa je potreben preskus zmesi, je treba preučiti, ali bo zagotovil sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.

6. Pred začetkom preskusa je pomembno imeti informacije o fizikalno-kemijskih lastnostih preskusne kemikalije, zlasti da se omogoči priprava stabilnih raztopin kemikalije. Prav tako je treba imeti ustrezno občutljivo analitsko metodo za preverjanje koncentracij preskusne kemikalije.

NAČELO PRESKUSA

7. Preskus se začne s tritedensko izpostavitvijo spolno zrelih samcev in samic (najmanj 12 tpo) v parih za razmnoževanje, med katero se preskusna kemikalija vnaša v organizem starševske generacije (F0) glede na njeno toksikokinetično obnašanje. Čim bližje prvemu dne četrtega tedna se odvzamejo ikre, da se začne generacija F1. Med vzrejo generacije F1 (skupaj 15 tednov) se ocenita valilnost in preživetje. Poleg tega se odvzame vzorec rib pri 9. do 10. tpo za razvojne končne točke, drstenje pa se ocenjuje tri tedne od 12. do 14. tpo. Generacija F2 se začne po tretjem tednu od ocene razmnoževanja in vzreja do konca izvalitve.

MERILA ZA VELJAVNOST PRESKUSA

8. Uporabljajo se naslednja merila za veljavnost preskusa:

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom ≥ 60 % nasičenosti z zrakom;

— srednja temperatura vode mora biti med celotnim trajanjem študije med 24 in 26 °C. Kratkotrajna odstopanja od srednje vrednosti v posameznih akvarijih ne smejo presegati 2 °C;

▼M8

— srednja plodnost kontrol v vsaki generaciji (F0 in F1) mora biti večja od 20 iker na par na dan. Fertilnost vseh iker, odloženih med oceno, mora biti več kot 80-odstotna. Poleg tega mora 16 od priporočenih 24 kontrolnih parov za razmnoževanje (> 65 %) proizvesti več kot 20 iker na par na dan;

— valilnost iker mora biti ≥ 80 % (povprečno) v kontrolah (v vsaki od generacij F1 in F2);

— preživetje po izvalitvi do 3 tpo in od 3 tpo do konca za generacijo F1 (tj. 15 tpo) mora biti ≥ 80-odstotno (povprečno) oziroma ≥ 90-odstotno (povprečno) v kontrolah (F1);

— na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti.

Kar zadeva temperaturo vode, čeprav to ni merilo za veljavnost, se ponovljeni vzorci v okviru tretiranja ne smejo statistično razlikovati drug od drugega in tretirane skupine v okviru preskusa se ne smejo statistično razlikovati druga od druge (na podlagi dnevnih meritev temperature in brez kratkotrajnih odstopanj).

9. Čeprav se lahko v bolj izpostavljenih skupinah ugotovi zmanjšano razmnoževanje, je potrebno zadostno razmnoževanje v vsaj tretji najbolj izpostavljeni skupini in vseh manj izpostavljenih skupinah generacije F0, da se zapolnijo valilniki. Poleg tega je potrebno zadostno preživetje zarodkov v tretji najbolj izpostavljeni skupini in manj izpostavljenih skupinah v generaciji F1, da se omogoči ocena končnih točk pri vzorčenju mladostnih osebkov (glej odstavka 36 in 38 ter Dodatek 9). Poleg tega je potrebno vsaj minimalno preživetje po izvalitvi (~ 20-odstotno) v drugi najbolj izpostavljeni skupini generacije F1. To niso merila veljavnosti kot taka, ampak priporočila, da se omogoči izračun približnih NOEC.

10. Če je ugotovljeno odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost rezultatov preskusa ter ta odstopanja in razmisleke vključiti v poročilo o preskusu.

OPIS METODE

Oprema

11. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

(a) oksimetri in merilniki pH;

(b) oprema za določanje trdote in alkalnosti vode;

(c) ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje;

(d) akvariji iz kemijsko inertnih materialov in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej Dodatek 3);

(e) ustrezno natančna tehtnica (tj. natančna na 0,5 mg).

▼M8

Voda

12. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri preskusna vrsta kaže primerno dolgotrajno preživetje in rast. Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmikih jemati vzorce za analizo. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti na primer vsakih šest mesecev, kadar se ve, da je kakovost vode za redčenje relativno konstantna. Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju ± 0,5 pH enote.

Sistem izpostavljenosti

13. Koncept in materiali, uporabljeni za sistem izpostavljenosti, niso določeni. Za postavitev preskusnega sistema je treba uporabiti steklo, nerjavno jeklo ali druge kemijsko inertne materiale, ki med predhodnimi preskusi niso bili kontaminirani. Za namen tega preskusa lahko primeren sistem izpostavljenosti zajema kontinuiran pretočni sistem (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Preskusne raztopine

14. Osnovno raztopino preskusne kemikalije je treba v sistem izpostavljenosti dovajati z ustrezno črpalko. Pretok osnovne raztopine je treba pred začetkom izpostavljenosti umeriti v skladu z analitsko potrditvijo preskusnih raztopin in ga med preskusom redno volumetrično preverjati. Preskusna raztopina v vsaki komori se ustrezno obnavlja (npr. najmanj 5 izmenjav količine/dan do 16 izmenjav količine/dan ali pretok 20 ml/min), odvisno od stabilnosti preskusne kemikalije in kakovosti vode.

15. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo saturacijske kolone/sistemi ali metode pasivnega odmerjanja (14). Čim bolj si je treba prizadevati za neuporabo topil ali nosilcev, ker: (1) lahko nekatera topila povzročijo toksičnost in/ali neželene ali nepričakovane odzive, (2) lahko preskušanje kemikalij nad njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev učinkovitih koncentracij, (3) lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobno dejavnostjo, kar lahko vpliva na okoljske pogoje in zmožnost vzdrževanja koncentracij izpostavljenosti, ter (4) ob neobstoju preteklih podatkov, ki kažejo, da topilo ne vpliva na rezultat študije, uporaba topil zahteva kontrolno tretiranje s topilom, kar ima posledice za dobrobit živali, saj so za izvedbo preskusa potrebne dodatne živali. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD št. 23 za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (15). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti preskusne kemikalije in razpoložljivosti preteklih podatkov o uporabi topila. Če se uporabijo topila kot nosilci, je treba poleg (negativnih) kontrol brez topila (samo voda za redčenje) oceniti ustrezne kontrole s topilom. Če se uporabi topila ni mogoče izogniti in se pojavi mikrobna dejavnost (razvoj biofilma), se med celotnim preskusom priporoča evidentiranje/sporočanje razvoja biofilma po akvarijih (vsaj tedensko). V idealnih razmerah bi morala biti koncentracija topila konstantna v kontroli s topilom

▼M8

in vseh preskusnih tretiranjih. Če koncentracija topila ni konstantna, je treba v kontroli s topilom uporabiti najvišjo koncentracijo topila v preskusnem tretiranju. Kadar se uporabi topilo kot nosilec, najvišje koncentracije topila ne smejo presegati 100 µl/l ali 100 mg/l (15), priporočljivo pa je tudi, da koncentracija topila ostane čim nižja (npr. < 20 µl/l), da bi se izognili morebitnemu učinku topila na izmerjene končne točke (16).

Preskusne živali

Izbira in vzdrževanje rib

16. Preskusna vrsta je japonska medaka *Oryzias latipes,* in sicer zaradi kratkega življenjskega cikla in možnosti določitve genetskega spola. Čeprav se lahko podobnemu preskusnemu protokolu prilagodijo druge vrste majhnih rib, se posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno predstavljene pri tej preskusni metodi, uporabljajo samo za japonsko medako (glej odstavek 1). Medaka je že pripravljena za razmnoževanje v ujetništvu; objavljene so metode za njeno gojenje (17) (18) (19), poleg tega so na voljo podatki iz preskusov v zvezi s kratkoročno smrtnostjo, zgodnjo življenjsko fazo in celotnim življenjskim ciklom (5) (6) (8) (9) (20). Za vse ribe velja svetlobni cikel, v katerem svetloba traja 16 ur, tema pa 8 ur. Ribe se hranijo z živimi navpliji solinskih rakcev vrste *Artemia*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu, je treba redno analizirati glede prisotnosti onesnaževal.

17. Če se upoštevajo ustrezne ribogojske prakse, poseben protokol gojenja ni potreben. Medake se lahko na primer gojijo v dvolitrskih akvarijih z 240 larvalnimi ribami na akvarij do 4. tpo, nato se lahko gojijo v dvolitrskih akvarijih z 10 ribami na akvarij do 8. tpo, nato pa se v parih za razmnoževanje prenesejo v dvolitrske akvarije.

Aklimatizacija in izbira rib

18. Preskusne ribe je treba izbrati iz enega samega laboratorijskega staleža, ki se je vsaj dva tedna pred preskusom aklimatiziral v podobnih pogojih kakovosti vode in osvetljenosti, kot so tisti, ki se uporabijo v preskusu (opomba: to obdobje aklimatizacije ni *in situ* obdobje pred izpostavljenostjo). Priporočljivo je, da se preskusne ribe odvzamejo iz internega gojišča, saj je prestavljanje odraslih rib stresno in lahko vpliva na zanesljivo drstenje. Ribe je treba v celotnem obdobju vzdrževanja in med fazo izpostavljenosti hraniti dvakrat na dan z navpliji solinskih rakcev, ki se po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Za začetek tega preskusa in zagotovitev ustreznega števila ponovitev je potrebnih najmanj 42 parov za razmnoževanje (54 parov za razmnoževanje, če je potrebna kontrola s topilom, delno zaradi nepopolnih preteklih podatkov za podporo uporabi samo kontrole brez topila). Poleg tega je treba za vsak par za razmnoževanje iz generacije F0 preveriti, da je XX-XY (tj. običajni par spolnih kromosomov pri vsakem spolu), da se prepreči morebitna vključitev spontanih XX-samcev (glej odstavek 39).

▼M8

19. Med fazo aklimatizacije je treba evidentirati pogine pri gojenih ribah in po 48-urnem obdobju prilagajanja uporabiti naslednja merila:

— več kot 10-odstotna smrtnost gojene populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: celotna serija se zavrne;

— od 5- do 10-odstotna smrtnost populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: dvotedensko obdobje aklimatizacije se podaljša za dodatnih sedem dni; če je v teh dodatnih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se celotna serija zavrne;

— manj kot 5-odstotna smrtnost populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: serija se sprejme.

20. Ribe se v dvotedenskem obdobju aklimatizacije pred preskusom in v obdobju izpostavljenosti ne smejo zdraviti zaradi bolezni, zdravljenju bolezni pa se je treba po možnosti popolnoma izogniti. V študiji se ne smejo uporabiti ribe s kliničnimi znaki bolezni. Voditi je treba evidenco opažanj in kakršnih koli profilaktičnih ali terapevtskih zdravljenj bolezni v obdobju gojenja pred preskusom.

21. Fazo izpostavljenosti je treba začeti s spolno dimorfnimi odraslimi ribami z določenim genetskim spolom iz laboratorijske zaloge razmnoževalno zrelih živali, gojenih pri 25 ± 2 °C. Ribe morajo biti v tednu pred izpostavljenostjo opredeljene kot dokazane plemenske ribe (tj. so že proizvedle viabilne potomce). Za celotno skupino rib, uporabljenih v preskusu, je treba teže posameznih rib po spolu na začetku preskusa vzdrževati v območju ± 20 % aritmetične sredine teže istega spola. Pred preskusom je treba stehtati podvzorec rib, da se oceni srednja teža. Izbrane ribe morajo biti najmanj 12 tpo, samice morajo tehtati ≥ 300 mg, samci pa ≥ 250 mg.

NAČRT PRESKUSA

Preskusne koncentracije

22. Priporoča se uporaba petih koncentracij kemikalije in kontrol. Pri izbiri območja preskusnih koncentracij je treba upoštevati vse vire informacij, vključno s kvantitativnimi razmerji med strukturo in aktivnostjo (QSAR), navzkrižnim branjem iz podobnih preskusov, rezultati preskusov pri ribah, kot so preskusi akutne toksičnosti (poglavje C.1 te priloge), kratkotrajni preskus razmnoževanja rib (poglavje C.48 te priloge) in druge preskusne metode, npr. poglavja C.15, C.37, C.41, C.47 ali C.49 te priloge (21) (22) (23) (24) (25) (26), če so na voljo, ali po potrebi iz preskusa za določanje območja, ki po možnosti vključuje fazo razmnoževanja. Preskus za določanje območja se po potrebi lahko izvede pod podobnimi pogoji (kakovost vode, preskusni sistem, število živali), kot se uporabijo za končni preskus. Če je treba uporabiti topilo in pretekli podatki niso na voljo, se lahko za opredelitev primernosti topila uporabi preskus za določanje območja. Najvišja

▼M8

preskusna koncentracija ne sme preseči topnosti v vodi, 10 mg/l ali 1/10 96h-LC50 (27). Najnižja koncentracija mora biti za 10- do 100-krat nižja od najvišje koncentracije. Uporaba petih koncentracij v tem preskusu omogoča ne samo meritev razmerja med odmerkom in odzivom, ampak zagotavlja tudi najnižjo koncentracijo z opaženim učinkom (LOEC) in NOEC, ki sta potrebni za oceno tveganja v nekaterih regulativnih programih ali jurisdikcijah. Na splošno je faktor razmika med nominalnimi koncentracijami preskusne kemikalije med sosednjimi stopnjami tretiranja ≤ 3,2.

Ponovljeni vzorci v okviru tretiranih skupin in kontrol

23. Uporabiti je treba najmanj šest ponovitvenih preskusnih komor na preskusno koncentracijo (glej Dodatek 7). Med fazo razmnoževanja (razen generacije F0) se ponovitvena struktura podvoji za oceno plodnosti, vsak ponovljeni vzorec pa ima samo en par za razmnoževanje (glej odstavek 42).

24. Poleg preskusnih koncentracij je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje in po potrebi kontrolo s topilom. Uporabiti je treba podvojeno število ponovitvenih komor za kontrole, da se zagotovi ustrezna statistična moč (tj. za kontrole je treba uporabiti vsaj 12 ponovljenih vzorcev). V fazi razmnoževanja se število ponovljenih vzorcev v kontrolah podvoji (tj. najmanj 24 ponovljenih vzorcev, vsak ponovljeni vzorec ima samo en paritveni par). Po razmnoževanju lahko kontrolni ponovljeni vzorci vsebujejo največ 20 zarodkov (rib).

POSTOPEK

Začetek preskusa

25. Spolno aktivne odrasle ribe, uporabljene za začetek generacije F0 za preskus, se izberejo na podlagi dveh meril: starosti (običajno več kot 12 tpo, vendar se priporoča, da ne več 16 tpo) in teže (ki mora biti ≥ 300 mg za samice in ≥ 250 mg za samce).

26. Pari samic in samcev, ki izpolnjujejo zgornje specifikacije, se kot posamezni pari prenesejo v vsak ponovitveni akvarij, tj. 12 ponovljenih vzorcev v kontrolah in šest ponovljenih vzorcev v tretiranjih s kemikalijo na začetku preskusa. Tem akvarijem se naključno dodelita tretirana skupina (npr. T1–T5 in kontrola) in ponovljeni vzorec (npr. A–L v kontrolah in A–F v tretirani skupini), nato pa se vstavijo v sistem izpostavljenosti z ustreznim tokom v vsak akvarij.

Pogoji izpostavljenosti

27. Celotni povzetek parametrov in pogojev preskusa je na voljo v Dodatku 3. Ob upoštevanju teh specifikacij bi morale imeti kontrolne ribe vrednosti končnih točk podobne tistim, ki so navedene v Dodatku 4.

28. Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, pH in temperaturo v vsaj eni preskusni posodi vsake tretirane skupine in kontrole. Te meritve, razen temperature, je treba izvesti vsaj enkrat tedensko v celotnem obdobju izpostavljenosti. Srednja temperatura vode med celotnim trajanjem študije mora biti med 24 in 26 °C. Temperaturo je treba meriti vsak dan v celotnem obdobju izpostavljenosti. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju ± 0,5 pH enote. Ponovljeni vzorci v okviru tretiranja se ne smejo statistično razlikovati drug od drugega in tretirane skupine v okviru preskusa se ne smejo statistično razlikovati druga od druge (na podlagi dnevnih meritev temperature in brez kratkotrajnih odstopanj).

▼M8

Trajanje izpostavljenosti

29. V preskusu so spolno aktivne ribe iz generacije F0 izpostavljene tri tedne. V četrtem tednu se približno na 24. dan preskusa vzpostavi generacija F1, pari za razmnoževanje generacije F0 pa se humano usmrtijo, pri čemer se evidentirata teža in dolžina (glej odstavek 34). Temu sledi izpostavljenost generacije F1 dodatnih 14 tednov (skupaj 15 tednov za generacijo F1) in generacije F2 dva tedna do izvalitve. Skupno trajanje preskusa je v glavnem 19 tednov (tj. do izvalitve generacije F2). Časovni okviri za preskus so prikazani v preglednici 2 in podrobneje pojasnjeni v Dodatku 9.

Način hranjenja

30. Ribe se lahko hranijo s solinskimi rakci vrste *Artemia* (24 ur starimi navpliji) *ad libitum*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu, je treba redno analizirati glede prisotnosti onesnaževal, kot so organoklorni pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in poliklorirani bifenili (PCB). Izogibati se je treba hrani z visoko ravnjo endokrinih aktivnih snovi (tj. fitoestrogenov), ki bi lahko ogrozila odziv preskusa. Nezaužito hrano in iztrebke je treba odstraniti iz preskusnih posod v skladu z zahtevami, npr. s previdnim čiščenjem dna posameznega akvarija z uporabo sesalne natege. Enkrat ali dvakrat na teden je treba očistiti tudi stranice in dno vsakega akvarija (npr. s krtačenjem). Primer časovnega razporeda hranjenja je v Dodatku 5. Stopnja hranjenja temelji na številu rib na ponovljeni vzorec in se torej zmanjša v primeru poginov v ponovljenem vzorcu.

Analitsko določanje in meritve

31. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije. Vzpostaviti je treba vse potrebne analitske metode, vključno z zadostnim znanjem o stabilnosti kemikalije v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določajo v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsaj vsak teden v enem ponovljenem vzorcu za vsako tretirano skupino, pri čemer se vsak teden rotira med ponovljenimi vzorci iste tretirane skupine.

32. Med preskusom je treba v časovnih razmikih ustrezno preverjati pretok razredčila in osnovne raztopine (npr. najmanj trikrat tedensko). Priporočljivo je, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih. V primeru kemikalij, ki se opazno kopičijo v ribah, se lahko preskusne koncentracije znižajo, ko ribe zrastejo. V takih primerih je priporočljivo, da se v vsaki komori prilagodi stopnja izmenjave preskusne raztopine, da bi preskusne koncentracije ostale čim bolj konstantne.

Opažanja in izmerjene končne točke

33. Izmerjene končne točke za oceno mogočih učinkov na ravni populacije vključujejo plodnost, fertilnost, izvalitev, rast in preživetje. Vsak dan je treba opazovati tudi obnašanje in zabeležiti vsako neobičajno obnašanje. Druge mehanistične končne točke vključujejo mRNK *vtg* ali ravni proteina VTG v jetrih z imunološkim preskusom (28), spolne fenotipske označevalce, kot so značilne papile na predrepni plavuti pri samcih, histološko oceno gonadnega spola in histopatološko oceno ledvic, jeter in spolnih žlez (glej seznam končnih točk v preglednici 1). Vse te specifične končne točke se ocenijo v okviru določitve genetskega spola posameznega osebka na podlagi prisotnosti ali odsotnosti gena za določitev moškega spola *dmy* pri medaki

▼M8

(glej odstavek 41). Poleg tega se oceni tudi čas za drstenje. Na podlagi informacij iz štetja papil na predrepni plavuti se lahko izpeljejo tudi preprosta fenotipska razmerja med spoloma, da se posamezne medake fenotipsko opredelijo kot samci ali samice. Za to preskusno metodo se ne pričakuje, da bodo z njo zaznana majhna odstopanja od pričakovanega razmerja med spoloma, ker razmeroma majhno število rib na ponovljeni vzorec ne bo zagotovilo zadostne statistične moči. Prav tako se med histopatološko oceno ocenijo spolne žleze in izvedejo veliko močnejše analize za oceno fenotipa spolnih žlez v okviru genetskega spola.

34. Glavni namen te preskusne metode je oceniti morebitne učinke preskusne kemikalije, ki so pomembni za populacijo. Tudi mehanistične končne točke (VTG, SSZ in nekateri učinki na histopatološke spremembe spolnih žlez) lahko pomagajo pri ugotovitvi, ali endokrino delovanje sproži kakršen koli učinek. Vendar pa lahko na te mehanistične končne točke vplivajo tudi sistemske in druge toksičnosti. Zato se lahko podrobno ocenijo tudi histopatološke spremembe jeter in ledvic, da bi bolje razumeli kakršne koli odzive v mehanističnih končnih točkah. Če se te podrobne ocene ne izvedejo, je treba še vedno zabeležiti in sporočiti večje nepravilnosti, naključno ugotovljene med histopatološko oceno.

Humana usmrtitev rib

35. Ob končani izpostavljenosti generacij F0 in F1 in ko se vzamejo podvzorci mladostnih osebkov, je treba ribe evtanazirati s primernimi količinami raztopine za anestezijo (npr. trikain metan sulfonat, MS-222 (št. CAS 886-86-2, 100–500 mg/l), pufran s 300 mg/l NaHCO3 (natrijev bikarbonat, št. CAS 144-55-8)), da se zmanjša draženje sluznice. Če so pri ribah vidni znaki precejšnjega trpljenja (zelo hudo trpljenje, pogin je mogoče zanesljivo napovedati) in se obravnavajo kot umirajoče, je treba živali anestezirati in evtanazirati ter jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtne primere. Kadar se ribe evtanazirajo zaradi obolevnosti, je to treba zabeležiti in sporočiti. Odvisno od tega, kdaj med študijo so ribe evtanazirane, se lahko zadržijo za histopatološko analizo (fiksiranje rib za morebitno histopatologijo).

Ravnanje z ikrami in larvalnimi ribami

Odvzem iker od parov za razmnoževanje za razmnožitev naslednje generacije

36. Ikre se odvzamejo prvi dan (ali po potrebi prva dva dneva) 4. tedna preskusa za prehod z generacije F0 na generacijo F1 in 18. tedna preskusa za prehod z generacije F1 na generacijo F2. 18. teden preskusa ustreza generaciji F1, odraslim ribam 15 tpo (tednov po oploditvi). Pomembno je, da se dan pred začetkom odvzema iker odstranijo vse ikre iz vsakega akvarija, s čimer se zagotovi, da so vse ikre, odvzete od para za razmnoževanje, iz enega drstenja. Po drstenju samice medake včasih ikre nosijo blizu zadnjične odprtine, dokler iker ni mogoče odložiti na substrat. Če v akvariju ni substrata, je mogoče ikre najti pritrjene na samico ali na dnu akvarija. Odvisno od tega, kje so, se ikre bodisi previdno odstranijo s samice bodisi izsesajo z dna v 4. tednu preskusa pri generaciji F0 in 18. tednu preskusa pri generaciji F1. Vse ikre, odvzete v okviru tretiranja, se pred razdelitvijo v inkubacijske komore združijo.

▼M8

37. Filamente iker, ki povezujejo odložene ikre, je treba odstraniti. Oplojene ikre (do 20) se odvzamejo od vsakega para za razmnoževanje (1 par na ponovljeni vzorec), združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v primerne inkubacijske komore (dodatka 6 in 7). Z zelo kakovostnim stereomikroskopom je mogoče videti znake zgodnje oploditve/razvoja, kot so dvig oploditvene membrane (horija), delitev celic ali oblikovanje blastule. Inkubacijske komore se lahko vstavijo v ločene „inkubacijske akvarije“, vzpostavljene za vsako tretiranje (v takem primeru je treba v njih meriti parametre kakovosti vode in koncentracije preskusne kemikalije), ali v ponovitveni akvarij, v katerem bodo izvaljene ličinke (npr. zarod z mešičkom). Če je potreben drugi dan odvzema (23. dan preskusa), je treba združiti vse ikre obeh dni in jih nato sistematično porazdeliti v vsakega od ponovljenih vzorcev tretiranja.

Gojenje iker do izvalitve

38. Oplojene ikre se stalno mešajo, npr. z zračnimi mehurčki v inkubatorju za ikre ali navpičnim nihanjem inkubatorja za ikre. Vsak dan se preverja in evidentira smrtnost oplojenih iker (zarodkov). Odmrle ikre se odstranijo iz inkubatorjev (Dodatek 9). 7. dan po oploditvi (dpo) se mešanje ustavi ali zmanjša, da se oplojene ikre usedejo na dno inkubatorja. S tem se spodbudi izvalitev, ki se običajno zgodi naslednjega dne ali v naslednjih dveh dneh. Za vsako tretiranje in kontrolo se preštejejo izvaljene ličinke (mlade ličinke; zarod z mešičkom) (na podlagi združitve ponovljenih vzorcev). Oplojene ikre, ki se ne izvalijo do dvakratnika srednjega dne izvalitve v kontroli (običajno 16. ali 18. dpo), se štejejo za neviabilne in se zavržejo.

39. V vsak ponovitveni akvarij se prenese dvanajst izvaljenih ličink. Izvaljene ličinke iz inkubacijskih komor se združijo in sistematično razdelijo v ponovitvene akvarije (Dodatek 7). To je mogoče storiti tako, da se izvaljene ličinke naključno izberejo iz tretirane skupine in nato nediskriminatorno zaporedoma dodajajo v ponovitvene akvarije. Vsak akvarij mora vsebovati enako število (n = 12) izvaljenih ličink (vsak največ 20 ličink). Če ni dovolj izvaljenih ličink za zapolnitev vseh ponovljenih vzorcev tretiranja, je priporočljivo zagotoviti, da ima čim več ponovljenih vzorcev 12 izvaljenih ličink. Z ličinkami je mogoče varno ravnati s steklenimi pipetami s široko odprtino. Vse dodatne izvaljene ličinke je treba humano usmrtiti z anestetikom. V nekaj tednih pred vzpostavitvijo parov za razmnoževanje je treba evidentirati dan, ko je v posameznem ponovljenem vzorcu opaženo prvo drstenje.

Vzpostavitev parov za razmnoževanje

Odščip plavuti in določitev genotipskega spola

40. Genotipski spol z odščipom plavuti se določi od 9 do 10 tpo (tj. 12.–13. teden preskusa za generacijo F1). Vse ribe v akvariju se anestezirajo (z odobrenimi metodami, npr. IACUC), z zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti vsake ribe pa se odvzame majhen vzorec tkiva za določitev genotipskega spola osebka (29). Ribe iz ponovljenega vzorca se lahko namestijo v majhnih kletkah, po možnosti ena na kletko, v ponovitvenem akvariju. Alternativno sta lahko v vsaki kletki dve ribi, če ju je mogoče razlikovati. Ena metoda je, da se pri odvzemu vzorca tkiva različno odreže repna plavut (npr. z zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti).

▼M8

41. Genotipski spol medake se določi z identificiranim in sekvenciranim genom (*dmy*), ki se nahaja na kromosomu Y. Prisotnost *dmy* kaže osebek z geni XY ne glede na fenotip, medtem ko odsotnost *dmy* kaže osebek z geni XX ne glede na fenotip (30); (31). Iz vsakega dela odščipljene plavuti se ekstrahira deoksiribonukleinska kislina (DNK), prisotnost ali odsotnost *dmy* pa se lahko določi z metodami verižne reakcije s polimerazo (PCR) (glej Dodatek 9 v poglavju C.41 te priloge ali dodatka 3 in 4 v (29)).

Vzpostavitev parov za razmnoževanje

42. Informacije o genotipskem spolu se uporabijo za vzpostavitev parov za razmnoževanje XX-XY ne glede na zunanji fenotip, ki se lahko spremeni z izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Na dan po določitvi genotipskega spola vsake ribe se iz vsakega ponovljenega vzorca naključno izbereta dve ribi XX in dve ribi XY ter vzpostavita dva para za razmnoževanje XX-XY. Če v ponovljenem vzorcu ni bodisi dveh rib XX bodisi dveh rib XY, je treba ustrezne ribe pridobiti iz drugih ponovljenih vzorcev v okviru tretiranja. Prednostna naloga je, da je v vsakem tretiranju in v kontrolah (24) priporočeno število ponovitvenih parov za razmnoževanje (12). Ribe z očitnimi nepravilnostmi (težave s plavalnim mehurjem, deformacije hrbtenice, izjemne razlike v velikosti itd.) se pri vzpostavljanju parov za razmnoževanje izključijo. V fazi razmnoževanja za generacijo F1 mora vsak ponovitveni akvarij vsebovati le en par za razmnoževanje.

Vzorčenje mladostnih osebkov in ocena končnih točk

Vzorčenje rib, ki niso vključene v pare za razmnoževanje

43. Po vzpostavitvi parov za razmnoževanje se ribe, ki niso bile izbrane za nadaljnje razmnoževanje, humano usmrtijo za meritev končnih točk pri mladostnih osebkih v 12.–13. tednu preskusa (F1). Izjemno pomembno je, da se z ribami ravna tako, da je pri posamezni ribi še vedno mogoče ugotoviti genotipski spol, določen za izbiro parov za razmnoževanje. Vsi zbrani podatki se analizirajo v okviru genotipskega spola posameznih rib. Vsaka riba se uporabi za različne meritve končnih točk, med drugim za: določitev stopenj preživetja mladic/mladostnih osebkov (7.–12./13. teden preskusa (F1)), rasti v dolžino (standardna dolžina se lahko izmeri, če je bila repna plavut skrajšana zaradi vzorčenja za analizo genetskega spola. Skupna dolžina se lahko izmeri, če se za *dmy* vzorči le delček zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti) in telesne teže (tj. mokra teža, osušena s pivnikom), mRNK *vtg* (ali VTG) v jetrih in papil na predrepni plavuti (glej preglednici 1 in 2). Upoštevajte, da so za izračun srednje rasti v tretirani skupini potrebne tudi teže in dolžine parov za razmnoževanje.

Vzorčenje tkiva in meritev vitelogenina

44. Jetra se do meritev mRNK *vtg* (ali VTG) secirajo in shranijo pri ≤ –70 °C. Rep ribe, vključno s predrepno plavutjo, se shrani v ustreznem fiksativu (npr. Davidsonovem) ali fotografira, tako da je mogoče pozneje prešteti papile na predrepni plavuti. Po želji se lahko sočasno vzorčijo in shranijo druga tkiva (tj. spolne žleze). Koncentracijo VTG v jetrih je treba kvantificirati s homologno tehniko ELISA (glej priporočene postopke za medako v Dodatku 6 in poglavju C.48 te priloge). Agencija U.S EPA je vzpostavila tudi metode za

▼M8

kvantificiranje mRNK vtg, tj. ekstrakcijo mRNK gena *vtg I* iz vzorca jeter in kvantificiranje števila kopij gena *vtg I* (na ng skupne mRNK) s kvantitativno metodo PCR (29). Namesto določitve števila kopij gena *vtg* v kontrolnih in tretiranih skupinah je virom bolj prijazna in tehnično ne tako težavna metoda določitev relativne (stopenjske) spremembe v izražanju *vtg I* v kontrolnih in tretiranih skupinah.

Sekundarne spolne značilnosti

45. V običajnih okoliščinah imajo samo spolno zreli samci medake papile, ki se razvijejo na ploščicah nekaterih plavutnic predrepne plavuti kot sekundarna spolna značilnost in so lahko potencialni biooznačevalec za motnje endokrinega sistema. Metoda štetja papil na predrepni plavuti (število ploščic s papilami) je navedena v Dodatku 8. Število papil na predrepni plavuti na posamezni osebek se uporabi tudi, da se navedeni osebek glede na zunanji fenotip kategorizira kot samec ali samica za namen izračuna preprostega razmerja med spoloma v ponovljenem vzorcu. Medaka, pri kateri število presega 0, je opredeljena kot samec; medaka, pri kateri je število papil na predrepni plavuti 0, je opredeljena kot samica.

Ocena plodnosti in fertilnosti

46. Plodnost in fertilnost se v generaciji F0 ocenjujeta od 1. do 3. tedna preskusa, v generaciji F1 pa od 15. do 17. tedna preskusa. Ikre se pri vsakem paru za razmnoževanje odvzemajo vsak dan 21 zaporednih dni. Ikre se vsako jutro nežno odstranijo z ujetih samic in/ali izsesajo z dna akvarija. Za vsak ponovitveni par za razmnoževanje se vsak dan evidentirata plodnost in fertilnost. Plodnost je opredeljena kot število odloženih iker, fertilnost pa je funkcionalno opredeljena kot število oplojenih in viabilnih iker v času štetja. Ikre je treba prešteti čim prej po odvzemu.

47. Plodnost v ponovljenem vzorcu se vsak dan evidentira kot število iker na par za razmnoževanje, ki se analizira s priporočenimi statističnimi postopki z uporabo srednjih vrednosti za ponovljeni vzorec. Fertilnost v ponovljenem vzorcu je vsota števila fertilnih iker, ki jih proizvede par za razmnoževanje, deljena z vsoto števila iker, ki jih proizvede ta par. Statistično se fertilnost analizira kot delež na ponovljeni vzorec. Valilnost v ponovljenem vzorcu je število izvaljenih ličink, deljeno s številom vnesenih zarodkov (običajno 20). Statistično se valilnost analizira kot delež na ponovljeni vzorec.

Vzorčenje odraslih rib in ocena končnih točk

Vzorčenje rib, ki so vključene v pare za razmnoževanje

48. Po 17. tednu preskusa (tj. potem ko se je generacija F2 uspešno začela) se odrasle ribe generacije F1 humano usmrtijo in ocenijo različne končne točke (glej preglednici 1 in 2). Predrepna plavut se slika za oceno papil na predrepni plavuti (glej Dodatek 8) in/ali pa se rep takoj za zadnjično odprtino odstrani in fiksira za poznejše štetje papil. Ob tem se lahko po želji vzame vzorec dela repne plavuti in shrani za preverjanje genetskega spola (*dmy*). Po potrebi se lahko vzame vzorec tkiva, da se ponovi analiza *dmy* za preverjanje genetskega spola posameznih rib. Telesna votlina se odpre, da se omogoči perfuzija z ustreznimi fiksativi (npr. Davidsonovim), preden se celoten trup potopi v fiksativ. Če pa se pred fiksacijo opravi ustrezna permeabilizacija, telesne votline ni treba odpirati.

▼M8

Histopatologija

49. Pri vsaki ribi se histološko ocenijo patološke spremembe tkiva spolnih žlez (30); (29). Kot je navedeno v odstavku 33, lahko na druge mehanistične končne točke, ocenjene v tem preskusu (tj. VTG, SSZ in nekateri učinki na histopatološke spremembe spolnih žlez), vplivajo sistemske ali druge toksičnosti. Zato se lahko podrobno ocenijo tudi histopatološke spremembe jeter in ledvic, da bi bolje razumeli kakršne koli odzive v mehanističnih končnih točkah. Če se te podrobne ocene ne izvedejo, je treba še vedno zabeležiti in sporočiti večje nepravilnosti, naključno ugotovljene med histopatološko oceno. Čeprav se priporoča upoštevanje smernic o histopatologiji (29), bi bilo mogoče pregledati in primerjati („reading down‘) tretirane skupine z največjim učinkom (v primerjavi s kontrolo) in tretirane skupine brez učinka. Običajno se vsi vzorci obdelajo/segmentirajo, nakar jih preuči patolog. Če se uporabi tak primerjalni pristop („read-down“), je treba navesti, da se pri postopku Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) uporablja pričakovanje, da se s povečanjem odmerka poveča tudi biološki učinek (patologija). Če se torej proučuje samo en velik odmerek brez kakršnih koli vmesnih odmerkov, bo moč izgubljena. Če statistična analiza ni potrebna za ugotovitev, da velik odmerek nima učinka, potem je ta pristop lahko sprejemljiv. Iz te ocene se izpelje tudi fenotip spolnih žlez.

Druga opažanja

50. S preskusom MEOGRT se zagotovijo podatki, ki se lahko uporabijo (npr. pri pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov), da se sočasno ocenita najmanj dve splošni vrsti poteka neželenega izida (AOP), ki se konča z reproduktivno okvaro: (a) endokrine poti, ki vključujejo motnje na endokrini osi hipotalamus–hipofiza–spolne žleze (HPG), ter (b) poti, ki povzročajo zmanjšanja preživetja, rasti (dolžina in teža) in razmnoževanja z neendokrino toksičnostjo. V ta preskus so vključene tudi končne točke, ki se običajno merijo pri preskusih kronične toksičnosti, kot sta preskus v celotnem življenjskem ciklu in preskus v zgodnjem življenjskem obdobju, ter se lahko uporabijo za oceno nevarnosti, ki jo predstavljata neendokrino toksično delovanje in mehanizem endokrine toksičnosti. Med preskusom je treba obnašanje opazovati dnevno in zabeležiti vsako neobičajno obnašanje. Poleg tega je treba evidentirati vsak pogin ter izračunati preživetje do izločitve rib (6. do 7. teden preskusa), preživetje po izločitvi do vzorčenja mladostnih osebkov (9. do 10. tpo) in preživetje od vzpostavitve parov do vzorčenja odraslih rib.

Preglednica 1

Pregled končnih točk preskusa MEOGRT (*)

Življenjsko obdobje	Končna točka	Generacija
Zarodek (2 tpo)	Izvalitev (% in čas do izvalitve)	F1, F2
Mladica (4 tpo)	Preživetje	F1
Mladostni osebek (9 ali 10 tpo)	Preživetje	F1
	Rast (dolžina in teža)	

▼**M8**

Življenjsko obdobje	Končna točka	Generacija
	Vitelogenin (mRNK ali protein)	
	Sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti)	
	Zunanje razmerje med spoloma	
	Čas do 1. drstenja	
Odrasla riba (12 do 14 tpo)	Razmnoževanje (plodnost in fertilnost)	F0, F1
Odrasla riba (15 tpo)	Preživetje	F1
	Rast (dolžina in teža)	
	Sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti)	
	Histopatologija (spolne žleze, jetra, ledvice)	

(*) Te končne točke je treba statistično analizirati.

ČASOVNI OKVIR

51. Časovni okvir za preskus MEOGRT v preglednici 2 prikazuje preskus. Preskus MEOGRT vključuje 4 tedne izpostavljenosti odraslih rib generacije F0 in 15 tednov izpostavljenosti generacije F1 ter obdobje izpostavljenosti druge generacije (F2) do izvalitve (2 tpo). Dejavnost v času preskusa MEOGRT je povzeta v Dodatku 9.

Preglednica 2

Časovni okviri izpostavljenosti in meritev končnih točk za preskus MEOGRT

Časovni okvir izpostavljenosti in končnih točk za preskus MEOGRT

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Teden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Ključno življenjsko obdobje					**Zarodek**					**Ličinka**					**Mladica**			**Mladostni osebek**	**Odrasla riba**
Končne točke																			
Plodnost	F_0														F_1				
Fertilnost	F_0														F_1				
Izvalitev					F_1														F_2
Preživetje						F_1						F_1						F_1	
Rast				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenin												F_1							
Sekundarne spolne												F_1						F_1	
Histopatologija																		F_1	
Teden preskusa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- V načrtu poskusa je 7 skupin ponovljenih vzorcev
  - 5 za tretiranja s preskusno kemikalijo
  - 2 za kontrolna tretiranja (4, če se uporabi topilo)
- Zasnova v skupini
  - 12 ponovljenih vzorcev za razmnoževanje, patologijo odraslih osebkov in SSZ (od 10. do 18. ted.)
  - 6 ponovljenih vzorcev za izvalitev, preživetje, Vtg; ter SSZ in rast pri mladostnih osebkih (od 1. do 9. ted.)

SSZ: sekundarne spolne značilnosti; ted.: tedni;

Vtg: vitelogenin

▼M8

PODATKI IN POROČANJE

Statistična analiza

52. Ker je genotipski spol določen za vse preskusne ribe, je treba podatke analizirati ločeno za vsak genotipski spol (tj. XY samce in XX samice). Brez tega se bo statistična moč analize močno zmanjšala. Priporočljivo je, da se pri statističnih analizah podatkov upoštevajo postopki, opisani v dokumentu OECD z naslovom Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (32). Dodatek 10 vsebuje nadaljnje smernice za statistično analizo.

53. Načrt preskusa in izbira statističnih testov morata zagotavljati ustrezno moč opažanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC (32). Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Opredeliti je treba odstotek spremembe pri vsaki končni točki, ki je pomemben za zaznavanje ali oceno. Poskus mora biti zasnovan tako, da to omogoča. Enak odstotek spremembe najverjetneje ne bo veljal za vse končne točke, poleg tega izvedljivega poskusa najverjetneje ne bo mogoče zasnovati tako, da bodo ta merila izpolnjena pri vseh končnih točkah, zato se je treba pri ustreznem načrtovanju poskusa osredotočiti na končne točke, ki so pomembne za poskus. Statistični diagram in smernice so na voljo v Dodatku 10; namenjeni so pomoči pri obdelavi podatkov in izbiri najustreznejšega statističnega testa ali modela. Lahko se uporabijo tudi drugi statistični pristopi, vendar le, če so znanstveno utemeljeni.

54. Variacije je treba v vsakem nizu ponovljenih vzorcev analizirati z analizo variance ali s postopki kontingenčne tabele ter na podlagi zgornje analize izbrati zadostne in ustrezne metode statistične analize. Da bi naredili večkratno primerjavo med rezultati pri posameznih koncentracijah in rezultati kontrol, se za zvezne odzive priporoča uporaba regresijskega postopka (npr. testa po Jonckheere-Terpstraju). Kadar podatki niso skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, je treba uporabiti Dunnettov test ali Dunnov test (po ustrezni pretvorbi podatkov, če je to potrebno).

55. Za opredelitev plodnosti se ikre štejejo dnevno, vendar se lahko analizirajo kot skupno število iker ali kot ponovljena meritev. Dodatek 10 vsebuje podrobnosti o tem, kako se analizira ta končna točka. Za histopatološke podatke, ki so v obliki ocen resnosti, je bil razvit nov statistični test, tj. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Poročati je treba o vseh končnih točkah, opaženih pri tretiranjih s kemikalijo, ki se bistveno razlikujejo od ustreznih kontrol.

Pomisleki o analizi podatkov

Uporaba ogroženih stopenj tretiranja

57. Pri določanju, ali se očitna toksičnost kaže pri ponovljenem vzorcu ali celotnem tretiranju, se obravnava več dejavnikov, ki jih je treba izključiti iz analize. Očitna toksičnost je opredeljena kot > 4 smrtni primeri v katerem koli ponovljenem vzorcu med 3. in 9. tpo, ki jih ni mogoče pojasniti s tehnično napako. Drugi znaki očitne toksičnosti vključujejo hemoragijo, nenormalno obnašanje, nenormalne načine plavanja, anoreksijo in katere

▼M8

koli druge klinične znake bolezni. Za subletalne znake toksičnosti bodo lahko potrebne kvalitativne ocene, ki jih je vedno treba izvesti za kontrolno skupino z vodo za redčenje (samo čista voda). Če je očitna toksičnost opazna pri najbolj obremenjenih tretiranjih, je priporočljivo, da se ta tretiranja izključijo iz analize.

Kontrole s topilom

58. Uporabo topila je treba obravnavati le kot zadnjo možnost, ko so bile obravnavane že vse druge možnosti dovajanja kemikalije. Če se uporabi topilo, je treba skladno izvesti kontrolo z vodo za redčenje. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih učinkov topila. Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine z vodo za redčenje. Najpomembnejše končne točke, ki jih je treba obravnavati v tej analizi, so dejavniki rasti (teža), saj lahko nanje vplivajo splošne toksičnosti. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino z vodo za redčenje in kontrolno skupino s topilom, je treba za ugotovitev, ali je veljavnost preskusa ogrožena, uporabiti najboljšo strokovno presojo. Če se dve kontrolni skupini razlikujeta, je treba tretirane skupine, izpostavljene kemikaliji, primerjati s kontrolo s topilom, razen če je znano, da je zaželena primerjava s kontrolo z vodo za redčenje. Če med dvema kontrolnima skupinama ni statistično značilne razlike, se priporoča, da se tretirane skupine, izpostavljene preskusni kemikaliji, primerjajo z združenima kontrolnima skupinama (kontrolno skupino s topilom in kontrolno skupino z vodo za redčenje), razen če je znano, da je zaželena le primerjava s kontrolno skupino z vodo za redčenje ali kontrolno skupino s topilom.

Poročilo o preskusu

59. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija: fizikalne lastnosti in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusna vrsta:

— znanstveno ime, sev, če je na voljo, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

Preskusni pogoji:

— obdobje osvetljenosti;

— načrt preskusa (npr. velikost, material in vodna prostornina komor, število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število izvaljenih ličink na ponovljeni vzorec);

▼**M8**

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je uporabljeno);

— metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);

— analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;

— značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;

— nominalne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni;

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH, temperatura (merjena vsak dan) in koncentracija raztopljenega kisika;

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

Rezultati:

— dokazi, da so kontrole izpolnjevale splošna merila za veljavnost;

— podatki za kontrolno skupino (in kontrolo s topilom, kadar se uporabi) in tretirano skupino, kot so izvalitev (valilnost in čas do izvalitve) za F1 in F2, preživetje po izvalitvi za F1, rast (dolžina in telesna teža) za F1, genotipski spol in razlikovanje med spoloma (npr. sekundarne spolne značilnosti na podlagi papil na predrepni plavuti in histologije spolnih žlez) za F1, fenotipski spol za F1, sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti) za F1, mRNK *vtg* (ali protein VTG) za F1, histopatološka ocena (spolne žleze, jetra in ledvice) za F1 in razmnoževanje (plodnost in fertilnost) za F0, F1; (glej preglednici 1 in 2);

— pristop k statistični analizi (regresijska analiza ali analiza variance) in obdelava podatkov (uporabljeni statistični testi in modeli);

— koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za vsak ocenjeni odziv;

— najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC)) za vsak ocenjeni odziv ($p = 0,05$); EC_x za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 90- ali 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake;

— vsako odstopanje od te preskusne metode in odkloni od meril za sprejemljivost ter razmisleki o morebitnih posledicah za rezultat preskusa.

▼M8

60. Za rezultate meritev končnih točk je treba predstaviti srednje vrednosti in njihove standardne odklone (na podlagi ponovljenih vzorcev in koncentracij, če je mogoče).

VIRI

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 171), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(2) Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D. E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S. W., Johnson, R., Hardman, R. C., Flynn, K., in Au, D. W. T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1–36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(4) Benoit, D. A., Mattson, V. R., Olson, D. L. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Nakazono, A., Honjo, T., in Kobayashi, K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925–1930.

(6) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T., in Kobayashi, K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552–2560.

(7) Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., in Honjo, T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H., in Kobayashi, K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692–1698.

(9) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., in Kobayashi, K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487–1496.

(10) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M., in Tatarazako, N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288–295.

(11) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M., in Tatarazako, N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78–86.

(12) Nakamaura, A., Tamura, I., Takanobu, H., Yamamuro, M., Iguchi, T., in Tatarazako, N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes)*. Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Na voljo na: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., in McLachlan, M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593–599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 23.), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(16) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., in Pickford, D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny, J. S., Spehar, R. L., Mead, K. E., in Yousuff, S. C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger, C. S., Teh, S. J., in Hinton, D. E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287–1293.

(19) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., in Tanaka, M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley, K., in Teather, K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330–338.

(21) Poglavje C.15 te priloge: Ribe, preskus kratkotrajne toksičnosti na embriih in mladicah s hranilnim mešičkom.

(22) Poglavje C.37 te priloge: 21-dnevni preskus rib: Kratkotrajno presejalno preskušanje estrogenega in androgenega delovanja ter zaviranja aromataze.

(23) Poglavje C.41 te priloge: Preskus spolnega razvoja rib.

(24) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.

(25) Poglavje C.47 te priloge: Ribe, preskus toksičnosti za zgodnje razvojne stopnje.

(26) Poglavje C.49 te priloge: Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka.

(27) Wheeler, J. R., Panter, G. H., Weltje, L., in Thorpe, K. L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067–1076.

(28) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., in Iguchi, T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301–308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 227). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(30) Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M., in Schartl, M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S., in Sakaizumi, M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613–619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Pariz.

(33) Green, J. W., Springer, T. A., Saulnier, A. N., in Swintek, J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108–1116.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

ELISA: encimski imunski test.

Plodnost = število iker.

Fertilnost = število viabilnih iker/plodnost.

Dolžina do razcepa repne plavuti (FL): je dolžina od konice nosu do konca zajede med repnima plavutnicama in se uporablja za ribe, pri katerih je težko določiti, kje se konča hrbtenica (www.fishbase.org).

Valilnost = izvaljene ličinke/število zarodkov, vloženih v inkubator.

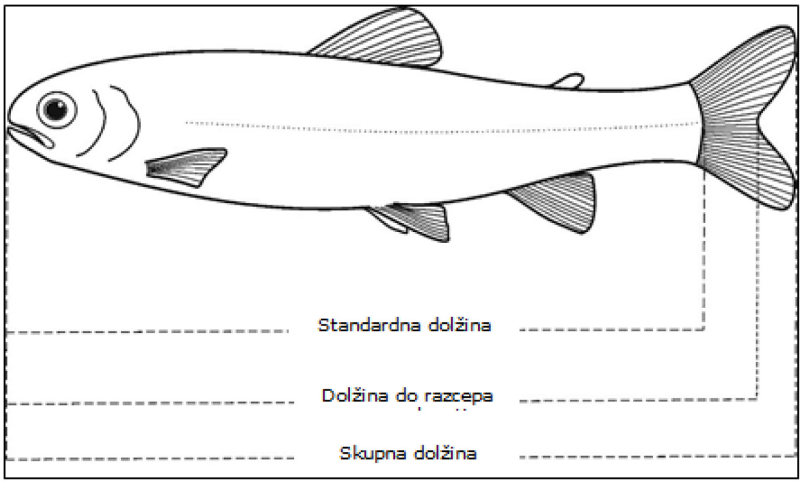
IACUC: odbor za varstvo in uporabo živali v laboratorijskih poskusih (Institutional Animal Care and Use Committee).

Standardna dolžina (SL): je dolžina ribe od konice nosu do posteriornega konca zadnjega hrbteničnega vretenca ali posteriornega konca osrednjega dela hipuralne plošče, kjer se konča hrbtenica. Ta meritev torej ne vključuje dolžine repne plavuti (www.fishbase.org).

Skupna dolžina (TL): je dolžina od konice nosu do skrajnega dela daljšega režnja repne plavuti in se običajno izmeri tako, da sta režnja stisnjena ob sredinski črti. To je meritev, ki se izvede v ravni črti in ne upošteva oblike telesa (www.fishbase.org).

Slika 1:

Opis različnih uporabljenih dolžin



ECx: (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti.EC50 je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

Pretočni preskus: preskus, pri katerem se preskusne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

Os HPG: os hipotalamus–hipofiza–spolne žleze.

▼**M8**

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

Stopnja obremenitve: mokra teža rib na prostornino vode.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC): je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC). Smernice so zajete v dodatkih 5 in 6.

Srednja smrtna koncentracija (LC50): je koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC): je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$) v danem obdobju izpostavljenosti.

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

Gostota rib: število rib na prostornino vode.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoprotein in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

TPO: tedni po oploditvi.

▼**M8**

Dodatek 2

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Snov	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amoniak	1 µg/l
preostali klor	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatek 3

PRESKUSNI POGOJI ZA PRESKUS MEOGRT

1.Priporočena vrsta	Japonska medaka (*Oryzias latipes*).
2.Vrsta preskusa	Kontinuirani pretočni sistem.
3.Temperatura vode	Nominalna temperatura pri preskusu je 25 °C. Srednja temperatura med celotnim preskusom v vsakem akvariju je od 24 do 26 °C.
4.Kakovost osvetlitve	Fluorescenčne sijalke (široki spekter in ~ 150 lumnov/m^2) (~ 150 luksov).
5.Obdobje osvetljenosti	16 ur svetlobe, 8 ur teme.
6.Stopnja obremenitve	F0: 2 odrasla osebka/ponovljeni vzorec; F1: začne se z največ 20 ikrami (zarodki)/ponovljeni vzorec, pri izvalitvi se zmanjša na 12 zarodkov/ponovljeni vzorec, nato na dva odrasla osebka (XX-XY par za razmnoževanje) pri 9. do 10. tpo za fazo razmnoževanja.
7.Najmanjša uporabna prostornina preskusne komore	1,8 l (npr. velikost preskusne komore: 18 x 9 x 15 cm).
8.Izmenjave količine preskusnih raztopin	Najmanj 5 izmenjav količine/dan do 16 izmenjav količine/dan (ali pretok 20 ml/min).
9.Starost preskusnih organizmov na začetku	F0: > 12 tpo, vendar je priporočljivo, da ne več kot 16 tpo.
10.Število organizmov na ponovljeni vzorec	F0: 2 ribi (par samca in samice); F1: največ 20 rib (iker)/ponovljeni vzorec (iz parov za razmnoževanje F0 in F1).
11.Število tretiranj	5 tretiranj s preskusno kemikalijo in ustrezne kontrole.
12. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje	Najmanj 6 ponovljenih vzorcev na tretiranje za preskusno kemikalijo in najmanj 12 ponovljenih vzorcev za kontrolo ter za kontrolo s topilom, če se uporabi (število ponovljenih vzorcev je podvojeno v fazi razmnoževanja v F1).
13. Število organizmov na preskus	Najmanj 84 rib v F0 in 504 v F1. (Če se uporabi kontrola s topilom, potem 108 rib v F0 in 648 v F1.) Enota, ki se šteje, je zarodek v fazi brez mešička.
14. Način hranjenja	Ribe se hranijo s solinskimi rakci vrste *Artemia* (24 ur starimi navpliji) *ad libitum*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu (primer načrta hranjenja za zagotovitev ustrezne rasti in razvoja, da se podpre zanesljivo razmnoževanje, je naveden v Dodatku 5).

▼**M8**

15. Prezračevanje	Brez prezračevanja, razen če se raztopljeni kisik približa < 60 % vrednosti nasičenosti z zrakom.
16. Voda za redčenje	Čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda.
17. Obdobje izpostavljenosti	V glavnem 19 tednov (od F0 do izvalitve F2).
18. Biološke končne točke (primarne)	Valilnost (F1 in F2); preživetje (F1, od izvalitve do 4. tpo (konec obdobja ličinke/začetek obdobja mladice), od 4. do 9. (ali 10.) tpo (začetek obdobja mladice do obdobja mladostnega osebka) in od 9. do 15. tpo (obdobje mladostnega osebka do konca odraslega osebka)); rast (F1, dolžina in teža pri 9 in 15 tpo); sekundarne spolne značilnosti (F1, papile na predrepni plavuti pri 9 in 15 tpo); vitelogenin (F1, mRNK *vtg* ali protein VTG pri 15 tpo); fenotipski spol (F1, na podlagi histologije spolnih žlez pri 15 tpo); razmnoževanje (F0 in F1, plodnost in fertilnost za 21 dni); čas do drstenja (F1) in histopatologija (F1, spolne žleze, jetra in ledvice pri 15 tpo).
19. Merila za veljavnost preskusa	Raztopljeni kisik ≥ 60 % vrednosti nasičenosti z zrakom; srednja temperatura vode od 24 do 26 °C med celotnim preskusom; uspešno razmnoževanje ≥ 65 % samic v kontrolah; srednja dnevna plodnost ≥ 20 iker v kontrolah; valilnost ≥ 80-odstotna (povprečno) v kontrolah (v vsaki od generacij F1 in F2); preživetje po izvalitvi do 3. tpo ≥ 80-odstotna (povprečno) in od 3. tpo do konca za generacijo ≥ 90-odstotna (povprečno) v kontrolah (F1), koncentracije preskusne kemikalije v raztopini je treba zadovoljivo vzdrževati v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti.

▼M8

Dodatek 4

SMERNICE O OBIČAJNIH KONTROLNIH VREDNOSTIH

Navesti je treba, da te kontrolne vrednosti temeljijo na omejenem številu validacijskih študij in se lahko spremenijo na podlagi nadaljnjih izkušenj.

Rast

Teža in dolžina se pri vseh vzorčenih ribah izmerita pri 9 ali (10) in 15 tednih po oploditvi (tpo). Z upoštevanjem tega protokola bo pričakovana mokra teža pri 9 tpo 85–145 mg za samce in 95–150 mg za samice. Pričakovana teža pri 15 tpo je 250–330 mg za samce in 280–350 mg za samice. Čeprav lahko pri posameznih ribah obstajajo precejšnja odstopanja od teh vrednosti, kontrolne srednje teže, ki bistveno odstopajo od teh razponov, zlasti nižje, kažejo na težave s hranjenjem, nadzorom temperature, kakovostjo vode, bolezen ali kombinacijo teh dejavnikov.

Izvalitev

Uspešnost izvalitve v kontrolah je običajno približno 90-odstotna, vendar tudi tako nizke vrednosti, kot je 80 %, niso neobičajne. Manj kot 75-odstotna uspešnost izvalitve lahko kaže na nezadostno mešanje razvijajočih se iker ali nezadostno skrb pri ravnanju z njimi, kot je nepravočasna odstranitev odmrlih iker, zaradi česar se lahko razvijejo glivične okužbe.

Preživetje

Stopnje preživetja do 3. tpo od izvalitve in po 3. tpo so običajno 90-odstotne ali višje pri kontrolah, vendar tudi tako nizke stopnje preživetja v zgodnjih življenjskih fazah, kot je 80 %, niso skrb vzbujajoče. Manj kot 80-odstotne stopnje preživetja v kontrolah so vzrok za zaskrbljenost in lahko kažejo na nezadostno čiščenje akvarija, ki vodi do izgube larvalnih rib zaradi bolezni ali zadušitve zaradi nizkih ravni raztopljenega kisika. Vzrok za pogine so lahko tudi poškodbe med čiščenjem bazena in izguba larvalnih rib prek sistema odtekanja vode iz akvarija.

Gen vitelogenin

Čeprav se lahko absolutne ravni gena *vitelogenin (vtg)*, izraženega kot kopije/ng celokupne mRNK, med laboratoriji zelo razlikujejo zaradi uporabljenih postopkov ali instrumentov, mora biti delež *vtg* pri kontrolnih samicah približno 200-krat večji kot pri kontrolnih samcih. Nič neobičajnega ni, če to razmerje sega celo od 1 000 do 2 000, vendar pa so razmerja, manjša od 200, sumljiva in lahko kažejo na težave z okužbo vzorca ali težave z uporabljenim postopkom in/ali reagenti.

Sekundarne spolne značilnosti

Pri samcih je običajni razpon sekundarnih spolnih značilnosti, opredeljen kot skupno število segmentov papil na plavutnicah predrepne plavuti, od 40 do 80 segmentov pri 9 do 10 tpo. Pri 15 tpo mora biti razpon pri kontrolnih samcih približno od 80 do 120 in 0 pri kontrolnih samicah. Iz nepojasnjenih razlogov nekateri samci v redkih primerih do 9. tpo nimajo prisotnih papil, ker pa vsi kontrolni samci razvijejo papile do 15. tpo, je vzrok za to verjetno zapoznel razvoj. Prisotnost papil pri kontrolnih samicah kaže na prisotnost XX-samcev v populaciji.

▼**M8**

XX-samci

Običajna pojavnost XX-samcev v kulturi se zdi približno 4-odstotna ali nižja pri 25 °C, pri čemer se pojavnost zvišuje z zviševanjem temperature. Sprejeti je treba ukrepe za zmanjšanje deleža XX-samcev v populaciji. Ker se zdi, da je pojavnost XX-samcev genetsko pogojena in torej dedna, je spremljanje staleža, ki se goji, in zagotavljanje, da se XX-samci ne uporabijo za razmnoževanje staleža, učinkovito sredstvo za zmanjšanje njihove pojavnosti v populaciji.

Drstenje

Drstenje v kontrolnih ponovljenih vzorcih je treba pred oceno plodnosti spremljati dnevno. Pri kontrolnih parih se lahko znaki drstenja ocenijo kvalitativno vizualno. Pri 12 do 14 tpo bi se morala drstiti večina kontrolnih parov. Majhno število drstečih se parov ob tem času kaže na morebitne težave z zdravjem, zrelostjo ali dobrim počutjem rib.

Plodnost

Zdrave in dobro hranjene medake pri 12 do 14 tpo se običajno drstijo vsak dan in proizvedejo od 15 do 50 iker na dan. 16 od priporočenih 24 kontrolnih parov za razmnoževanje (> 65 %) mora proizvesti več kot 20 iker na par na dan, lahko pa jih celo 40. Manjše število lahko kaže na nezrele, slabo hranjene ali nezdrave drsteče se pare.

Fertilnost

Delež fertilnih iker pri kontrolnih drstečih se parih je običajno v območju 90 %, pri čemer vrednosti, ki znašajo od 95 do 99 %, niso neobičajne. Manj kot 80-odstotne stopnje fertilnosti pri kontrolnih ikrah so sumljive in lahko kažejo na nezdrave osebke ali pogoje gojenja, ki niso idealni.

▼**M8**

Dodatek 5

PRIMER NAČRTA HRANJENJA

V preglednici 1 je prikazan primer načrta hranjenja za zagotovitev ustrezne rasti in razvoja, da se podpre zanesljivo razmnoževanje. Odstopanja od tega načrta hranjenja so sprejemljiva, vendar jih je priporočljivo preskusiti, da se preveri upoštevanje sprejemljive rasti in razmnoževanja. Da bi se upošteval predlagani načrt hranjenja, je treba pred začetkom preskusa določiti suho težo solinskih rakcev na količino kaše iz solinskih rakcev. To se lahko stori s tehtanjem opredeljene količine kaše iz solinskih rakcev, ki se je 24 ur sušila pri 60 °C na predhodno stehtanih posodah. Da bi se upoštevala masa soli v kaši, je treba posušiti tudi enako količino enake raztopine soli, uporabljene v kaši, jo stehtati in odšteti od teže posušene kaše iz solinskih rakcev. Alternativno se lahko solinski rakci pred sušenjem prefiltrirajo in sperejo z destilirano vodo, s čimer se odpravi potreba po merjenju mase „soli v kaši“. Ta podatek se uporabi za pretvorbo podatka v preglednici iz suhe teže solinskih rakcev v količino kaše iz solinskih rakcev, ki jo je treba dati ribam. Poleg tega je priporočljivo tedensko tehtati alikvote kaše iz solinskih rakcev in s tem preveriti, da se ribam daje pravilna suha teža solinskih rakcev.

Preglednica 1

Primer načrta hranjenja

Čas (po izvalitvi)	Solinski rakci (mg suhe teže/ribo/dan)
1. dan	0,5
2. dan	0,5
3. dan	0,6
4. dan	0,7
5. dan	0,8
6. dan	1,0
7. dan	1,3
8. dan	1,7
9. dan	2,2
10. dan	2,8
11. dan	3,5
12. dan	4,2
13. dan	4,5
14. dan	4,8
15. dan	5,2
16.–21. dan	5,6

▼**M8**

Čas (po izvalitvi)	Solinski rakci (mg suhe teže/ribo/dan)
4. teden	7,7
5. teden	9,0
6. teden	11,0
7. teden	13,5
8. teden–usmrtitev	22,5

▼**M8**

Dodatek 6

PRIMERA INKUBACIJSKE KOMORE ZA IKRE

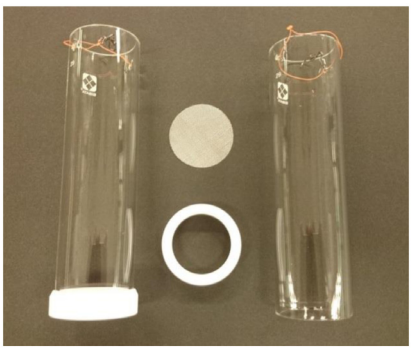
Primer A



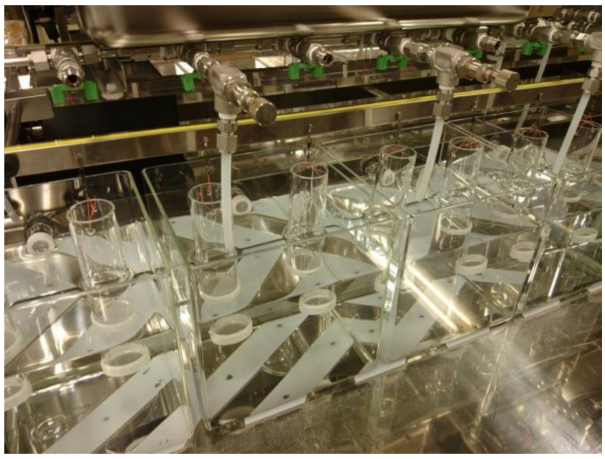


Ta inkubator je sestavljen iz prečno prerezane steklene centrifugirke, ki je povezana z ovojem iz nerjavnega jekla, na mesto pa je pritrjena z vijačno kapico. Iz kapice moli majhna steklena cevka ali cevka iz nerjavnega jekla, ki je nameščena blizu ukrivljenega dna in nežno meša zrak, da so ikre suspendirane in da se zmanjša prenos saprofitskih glivičnih okužb med njimi, obenem pa omogoča tudi izmenjavo kemikalije med inkubatorjem in zadrževalnim akvarijem.

Primer B



▼**M8**



Ta inkubator je sestavljen iz steklenega valjastega telesa (premer 5 cm, višina 10 cm) in nerjavne žičnate mrežice (0,25 φ in 32 mesh), ki je pritrjena na dno telesa s PTFE-obročkom. Inkubatorji so spuščeni z dvižne prečke v akvarije in se vertikalno stresajo (amplituda približno 5 cm) v ustreznem ciklu (približno vsake 4 sekunde) za ikre medake.

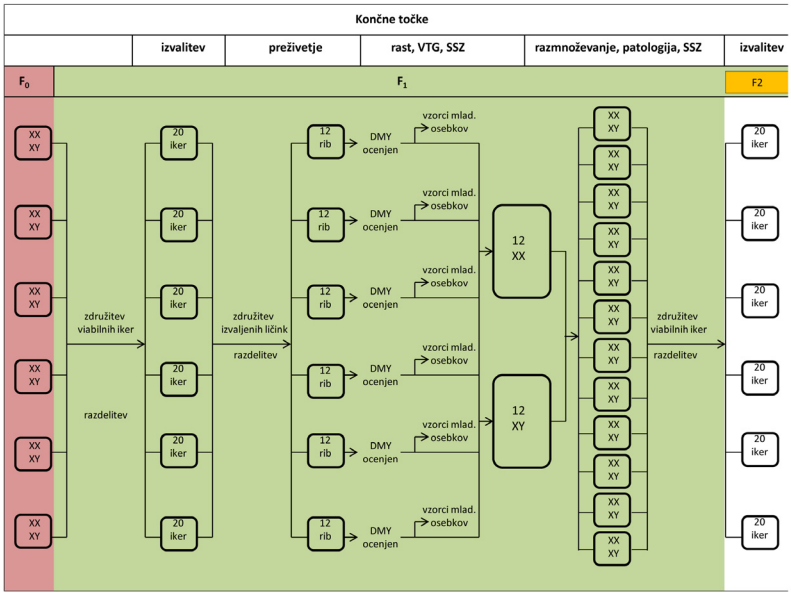
▼M8

Dodatek 7

SHEMATSKI DIAGRAM ZA ZDRUŽEVANJE IN VKLJUČEVANJE OSEBKOV V PONOVLJENE VZORCE SKOZI CELOTNO PRESKUSNO METODO MEOGRT

Slika 1

Združevanje in vključevanje osebkov v ponovljene vzorce v preskusu MEOGRT. Slika prikazuje eno tretiranje ali ½ kontrole. Zaradi združevanja identiteta ponovljenega vzorca ni stalna skozi celoten preskus.Upoštevajte, da se izraz „ikre“ nanaša na viabilne, oplojene ikre (enakovredne zarodkom).



Tretiranja in ponovitve

V tej preskusni metodi se priporoča pet tretiranj s preskusno kemikalijo z uporabo materiala ustrezne tehnične kakovosti in negativna kontrola. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje ne ostane konstantno med celotnim preskusom MEOGRT, število ponovljenih vzorcev v kontrolnem tretiranju pa je dvakratnik vsakega posameznega tretiranja s preskusno kemikalijo. V generaciji F0 je pri vsakem tretiranju s preskusno kemikalijo šest ponovljenih vzorcev, medtem ko je pri negativni kontroli 12 ponovljenih vzorcev. Topila so močno odsvetovana, če pa se uporabijo, je treba v poročilo o preskusu MEOGRT vključiti utemeljitev tako za uporabo topila kot tudi za izbiro topila. Če se uporabi topilo, sta poleg tega potrebni dve vrsti kontrol: (a) kontrola s topilom in (b) negativna kontrola. Vsaka od teh dveh kontrolnih skupin mora vsebovati celoten niz ponovljenih vzorcev na vseh točkah časovnega okvira preskusa MEOGRT. Ta struktura ponovljenih vzorcev ostane enaka ves čas razvoja preskusnega organizma v generaciji F1 (in F2 do izvalitve). Vendar pa se v fazi odraslih rib, ko se vzpostavijo pari za razmnoževanje generacije F1, število ponovljenih vzorcev s pari za razmnoževanje na tretiranje v optimalnem primeru podvoji; obstaja torej do 12 ponovitvenih parov v vsakem tretiranju s preskusno kemikalijo in 24 ponovitvenih parov v kontrolni skupini (in po potrebi še 24 ponovitvenih parov v kontroli s topilom). Določitev izvalitve iz zarodkov, ki so jih odložili pari F1, se opravi na podlagi enake ponovitvene strukture, kot je bila uporabljena za zarodke, ki so jih odložili pari F0, kar pomeni šest ponovljenih vzorcev na tretiranje s preskusno kemikalijo in 12 ponovljenih vzorcev v kontrolnih skupinah.

▼**M8**

Dodatek 8

ŠTETJE PAPIL NA PREDREPNI PLAVUTI

Glavni materiali in reagenti

— Stereomikroskop (z neobvezno kamero)

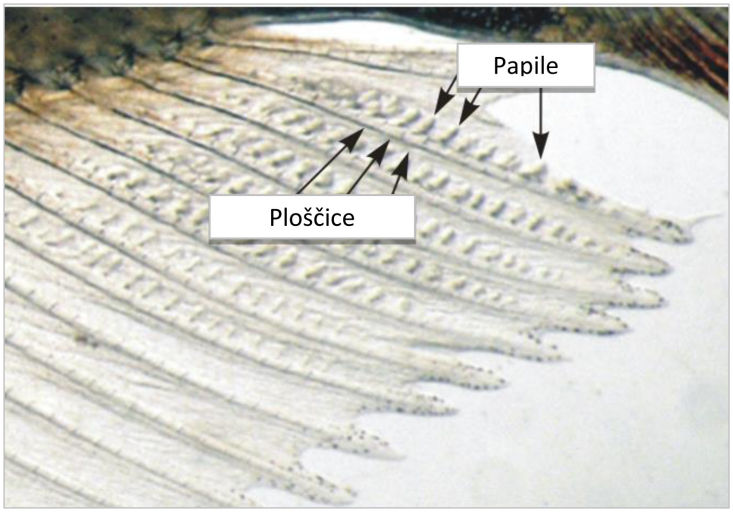
— Fiksativ (npr. Davidsonov (Bouinov ni priporočen)), če se papile ne štejejo po sliki

Postopki

Po obdukciji je treba predrepno plavut slikati, da se omogoči ustrezno štetje papil na predrepni plavuti. Čeprav je slikanje priporočena metoda, se lahko predrepna plavut približno 1 minuto fiksira z Davidsonovim ali drugim ustreznim fiksativom. Pomembno je, da je predrepna plavut med fiksiranjem ravna, da se omogoči lažje štetje papil. Trup s predrepno plavutjo se lahko do analize shrani v Davidsonovem ali drugem ustreznem fiksativu. Preštejte število ploščic (glej **sliko 1**) s papilami, ki štrlijo iz posteriornega roba ploščice.

Slika 1

Papile na predrepni plavuti



▼M8

Dodatek 9

PODROBEN ČASOVNI OKVIR PRESKUSA MEOGRT

1. do 3. teden preskusa (F0)

Drsteče se ribe generacije F0, ki izpolnjujejo merila za izbiro (glej odstavke od 16 do 20), so izpostavljene tri tedne, da bi bile lahko razvijajoče se gamete in tkivo spolnih žlez izpostavljeni preskusni kemikaliji. Vsak ponovitveni akvarij vključuje en sam par rib za razmnoževanje (par za razmnoževanje XX-samica in XY-samec). Odložene ikre se odvzemajo, štejejo in ocenjujejo glede fertilnosti 21 zaporednih dni, začenši s 1. dnem preskusa.

4. teden preskusa (F0 in F1)

Zaželeno je, da se oplojene in viabilne ikre (zarodki) odvzamejo na isti dan; če zarodkov ni dovolj, pa se lahko odvzamejo v dveh dneh. Če se odvzamejo v dveh dneh, se vsi zarodki v okviru tretiranj, ki so bili odvzeti prvi dan, združijo z zarodki, odvzetimi drugi dan. Nato se vsi združeni zarodki za vsako tretiranje naključno razdelijo v vse ponovitvene inkubatorje, in sicer po 20 zarodkov na inkubator. Vsak dan se preverja in evidentira smrtnost oplojenih iker (zarodkov). Odmrle ikre se odstranijo iz inkubatorjev (odmrle ikre je mogoče zlasti v zgodnjih stopnjah prepoznati po opazni izgubi prosojnosti in spremembi barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz; OECD 2010).

Opomba: Če je drugi dan odvzema potreben za eno samo tretiranje, morajo temu postopku slediti vsa tretiranja (vključno s kontrolami). Če po drugem dnevu odvzema ni dovolj zarodkov v okviru tretiranja, da bi se v inkubatorje vložilo po 20 zarodkov, zmanjšajte število zarodkov, vloženih v okviru tega določenega tretiranja, na 15 zarodkov na inkubator. Če ni dovolj zarodkov za vložitev 15 zarodkov na inkubator, zmanjšajte število ponovitvenih inkubatorjev, tako da bo dovolj zarodkov za 15 zarodkov na inkubator. Poleg tega se lahko v F0 doda več parov za razmnoževanje na tretiranje in kontrole, da se proizvede več iker za dosego priporočenih 20 zarodkov na ponovljeni vzorec.

Na 24. dan preskusa se pari za razmnoževanje generacije F0 humano usmrtijo, pri čemer se evidentirata teža in dolžina. Po potrebi se lahko pari za razmnoževanje generacije F0 ohranijo še en ali dva dni, da se znova začne generacija F1.

5. in 6. teden preskusa (F1)

En do dva dneva pred predvidenim začetkom izvalitve ustavite ali zmanjšajte mešanje iker v inkubatorju, da pospešite izvalitev. Ker se zarodki valijo vsak dan, se izvaljene ličinke združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v vsak ponovitveni akvarij za ličinke v okviru določenega tretiranja, ki ne vsebuje več kot 12 izvaljenih ličink. To se stori tako, da se izvaljene ličinke naključno izberejo in nato nediskriminatorno zaporedoma vključijo v ponovljene vzorce ter tako po vrsti prek ponovljenih vzorcev določenega tretiranja, dokler ni v vseh ponovljenih vzorcih v okviru tretiranja 12 izvaljenih ličink. Če ni dovolj izvaljenih ličink, da bi zapolnili vse ponovljene vzorce, je treba zagotoviti, da ima čim več ponovljenih vzorcev 12 izvaljenih ličink, da se začne faza F1.

Ikre, ki se niso izvalile do dvakratnika srednjega kontrolnega dne izvalitve, se štejejo za neviabilne in se zavržejo. Število izvaljenih ličink se evidentira in izračuna se uspešnost izvalitve (valilnost) v vsakem ponovljenem vzorcu.

▼M8

7. do 11. teden preskusa (F1)

Vsak dan se preverja in evidentira preživetje larvalnih rib v vseh ponovljenih vzorcih. Na 43. dan preskusa se evidentirata število preživelih rib v vsakem ponovljenem vzorcu in tudi začetno število izvaljenih ličink, vstavljenih v ponovljeni vzorec (nominalno 12). To omogoča izračun stopnje preživetja od izvalitve do faze mladostnega osebka.

12. teden preskusa (F1)

Na 78.–85. dan preskusa se z repne plavuti vsake ribe odvzame majhen vzorec tkiva za določitev genotipskega spola osebka (tj. odščip plavuti) pri vseh ribah. Ta podatek se uporabi za vzpostavitev parov za razmnoževanje.

V treh dneh po določitvi genotipskega spola vsake ribe se naključno vzpostavi 12 parov za razmnoževanje na tretiranje in 24 parov na kontrolo. Iz vsakega ponovljenega vzorca se naključno izbereta po dve ribi XX in XY, ki se nato združijo po spolu, ter nato naključno izberejo za vzpostavitev para za razmnoževanje (tj. par XX-XY). Vzpostavi se najmanj 12 ponovljenih vzorcev na tretiranje s kemikalijo in najmanj 24 ponovljenih vzorcev za kontrolo z enim parom za razmnoževanje na ponovljeni vzorec. Če v ponovljenem vzorcu ni bodisi dveh rib XX bodisi dveh rib XY, ki so na voljo za združevanje, je treba ribe z ustreznim genotipskim spolom pridobiti iz drugih ponovljenih vzorcev v okviru tretiranja.

Preostale ribe (največ 8 rib na ponovljeni vzorec) se humano usmrtijo in vzorčijo za različne končne točke pri mladostnih osebkih. Podatki o *dmy* (XX ali XY) za vse vzorce mladostnih osebkov se ohranijo za zagotovitev, da je mogoče vse podatke o končnih točkah povezati z genetskim spolom vsake posamezne ribe.

13. in 14. teden preskusa (F1)

Izpostavljenost se nadaljuje, ko se pari mladostnih osebkov za razmnoževanje razvijajo v odrasle ribe. Na 98. dan preskusa (tj. dan pred začetkom odvzema iker) se ikre odstranijo iz akvarijev in s samic.

15. do 17. teden preskusa (F1)

Odložene ikre se odvzemajo dnevno 21 zaporednih dni v vsakem ponovljenem vzorcu, ocenita se plodnost in fertilnost.

18. teden preskusa (ponovitev 4. tedna preskusa) (F1 in F2)

Na 120. dan preskusa se zjutraj odvzamejo ikre v vsakem ponovitvenem akvariju. Odvzete ikre se ocenijo, oplojene ikre (z odstranjenimi filamenti) vsakega od parov za razmnoževanje pa se združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v inkubacijske komore za ikre z 20 oplojenimi ikrami na inkubator. Inkubatorji se lahko postavijo v ločene „inkubacijske akvarije“, vzpostavljene za vsako tretiranje, ali v ponovitveni akvarij, ki bo po izvalitvi vseboval izvaljene ličinke. Zaželeno je, da se zarodki odvzamejo na isti dan; če pa jih ni dovolj, se lahko odvzamejo v dveh dneh. Če se odvzamejo v dveh dneh, se vsi zarodki v okviru tretiranj, ki so bili odvzeti prvi dan, združijo z zarodki, odvzetimi drugi dan. Nato se vsi združeni zarodki za vsako tretiranje naključno razdelijo v vse ponovitvene inkubatorje, in sicer po 20 zarodkov na inkubator. Opomba: če je drugi dan

▼M8

odvzema potreben za eno samo tretiranje, morajo temu postopku slediti vsa tretiranja (vključno s kontrolami). Če po drugem dnevu odvzema ni dovolj zarodkov v okviru tretiranja, da bi se v inkubatorje vložilo po 20 zarodkov, zmanjšajte število zarodkov, vloženih v okviru tega določenega tretiranja, na 15 zarodkov na inkubator. Če ni dovolj zarodkov za vložitev 15 zarodkov na inkubator, zmanjšajte število ponovitvenih inkubatorjev, tako da bo dovolj zarodkov za 15 zarodkov na inkubator.

Na 121. dan preskusa (ali 122. dan preskusa, da se zagotovi dober začetek generacije) se pari za razmnoževanje generacije F1 humano usmrtijo in analizirajo za končne točke pri odraslih ribah. Po potrebi se lahko pari za razmnoževanje generacije F1 ohranijo še en ali dva dni, da se znova začne generacija F2.

19. in 20. teden preskusa (F2)

En do dva dneva pred predvidenim začetkom izvalitve ustavite ali zmanjšajte mešanje iker v inkubatorju, da pospešite izvalitev. Če se preskus konča z dokončno izvalitvijo generacije F2, se izvaljene ličinke vsak dan evidentirajo in zavržejo. (Zarodki, ki se niso izvalili po podaljšanem času inkubacije, opredeljenem kot dvakratnik srednjega kontrolnega dne izvalitve, se štejejo za neviabilne.)

▼M8

Dodatek 10

STATISTIČNA ANALIZA

Vrste bioloških podatkov, pridobljenih s preskusom MEOGRT, niso edinstvene zanj, tako da so bile razen za podatke o patologiji razvite številne ustrezne statistične metodologije za pravilno analizo podobnih podatkov, odvisne od značilnosti podatkov, vključno z normalnostjo, homogenostjo variance, s tem, ali načrt študije omogoča preskušanje predpostavk ali regresijsko analizo, parametrskimi in neparametrskimi preskusi itd. Na splošno predlagane statistične analize sledijo priporočilom OECD za podatke o ekotoksičnosti (OECD 2006), diagram poteka odločanja za analizo podatkov preskusa MEOGRT pa je prikazan v preglednici 2.

Predvideva se, da bodo podatkovni nizi najpogosteje prikazali monotone odzive. Poleg tega je treba razmisliti o vprašanju uporabe enostranskega statističnega testa v primerjavi z dvostranskim statističnim testom. Razen če obstajajo biološki razlogi, zaradi katerih enostranski test ne bi bil primeren, se predlaga uporaba enostranskih testov. Čeprav so v naslednjem oddelku priporočeni nekateri statistični testi, bodo, če bodo za uporabo za specifične podatke, pridobljene s preskusom MEOGRT, razvite ustreznejše in/ali močnejše statistične metode, ti statistični testi uporabljeni za okrepitev teh prednosti.

Podatke preskusa MEOGRT je treba analizirati ločeno za vsak genotipski spol. Obstajata dve strategiji za analizo podatkov o ribah z zamenjanim spolom (bodisi XX-samci bodisi XY-samice). (1) Izločite vse podatke o ribah z zamenjanim spolom v celotnem preskusu, razen prevalence zamenjave spola v vsakem ponovljenem vzorcu. (2) Pustite podatke o vseh ribah z zamenjanim spolom v podatkovnem nizu in analizo opravite na podlagi genotipa.

Histopatološki podatki

Histopatološki podatki se navedejo kot ocene resnosti, ki se določijo z novorazvitim statističnim postopkom, tj. Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al*., 2014). Pri *Rao-Scottovi* prilagoditvi se upoštevajo informacije o ponovitvah v preskusu; postopek *by Slices* vključuje biološko pričakovanje, da se ocene resnosti običajno zvišajo z zvišanjem koncentracij tretiranja. Za vsako diagnozo rezultat RSCABS opredeljuje, v katerih tretiranjih je prevalenca patologije višja kot v kontrolah, in s tem določa povezano stopnjo resnosti.

Podatki o plodnosti

Analize za podatke o plodnosti vključujejo regresijski test po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test za določitev učinkov tretiranja, če so podatki skladni z monotonim odzivom na koncentracijo. Pri regresijskem testu se vse primerjave opravijo na ravni značilnosti 0,05, prilagoditev za število opravljenih primerjav pa se ne izvede. Za podatke se pričakuje, da so skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, vendar pa je to mogoče preveriti bodisi z vizualnim pregledom podatkov bodisi z oblikovanjem linearnih in kvadratnih kontrastov srednjih vrednosti tretiranj po pretvorbi porazdelitve podatkov. Razen če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ne, se izvede trendni test. Sicer se za določitev učinkov tretiranja uporabi Dunnettov test, če so podatki normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc. Če te zahteve niso izpolnjene, se uporabi Dunnov test z Bonferonni-Holmovo prilagoditvijo. Vsi navedeni testi se izvedejo neodvisno od kakršnega koli celovitega F-testa ali Kruskal-Wallisovega testa. Več podrobnosti o tem je v OECD 2006.

▼M8

Uporabijo se lahko alternativne metode, kot je posplošeni linearni model s Poissonovimi napakami za štetje iker (brez pretvorbe), če so statistično utemeljene (Cameron in Trividi, 2013). Če se uporabi alternativni pristop, se priporoča statistično svetovanje.

Dnevno štetje iker v eni generaciji

Model analize variance ANOVA je podan z enačbo Y = čas*čas + tretiranje + *tretiranje + čas*tretiranje + *čas*tretiranje z naključnimi učinki ponovljenega vzorca (generacija*tretiranje), in čas*ponovljeni vzorec (tretiranje), ki dopušča neenake komponente variance obeh vrst po generacijah. Tukaj se čas nanaša na pogostost štetja iker (npr. na dan ali teden). To je analiza ponovljenih meritev s korelacijami med opažanji pri enakih ponovljenih vzorcih, ki predstavljajo naravo ponovljenih meritev podatkov.

Glavni učinki tretiranja se preskusijo z Dunnettovim (ali Dunnettovim in Hsujevim) testom, pri katerem se opravi prilagoditev za število primerjav. Potrebni sta prilagoditvi za glavni učinek generacije ali časa, saj pri teh dveh dejavnikih ni „kontrolne“ ravni in je vsak par ravni primerjava, ki bi lahko bila zanimiva. Če je za ta dva glavna učinka F-test za glavni učinek statistično značilen na ravni 0,05, potem se lahko parne primerjave po ravneh navedenega faktorja preskusijo na ravni 0,05 brez nadaljnje prilagoditve.

Model vključuje interakcije dveh in treh faktorjev, tako da glavni učinek za, na primer, čas, morda ne bo statistično značilen, čeprav ima čas pomemben učinek na rezultate. Če je torej interakcija dveh ali treh faktorjev, med katerimi je čas, statistično značilna na ravni 0,05, potem se lahko sprejmejo primerjave ravni časa na ravni značilnosti 0,05 brez nadaljnje prilagoditve.

Naslednji so F-testi za statistično značilnost tretiranja v okviru časa, tako imenovana območja v preglednici ANOVA. Če je na primer območje za tretiranje v okviru F1 in časa 12 statistično značilno na ravni 0,05, potem se lahko sprejmejo parne primerjave za tretiranje v okviru F1 in časa 12 na ravni 0,05 brez nadaljnje prilagoditve. Enake izjave veljajo za teste za čas v okviru F1 in tretiranja ter za generacijo v okviru časa in tretiranja.

Nazadnje, za primerjave, ki ne spadajo pod nobeno od navedenih kategorij, je treba primerjave prilagoditi z uporabo Bonferroni-Holmove prilagoditve za p-vrednosti. Dodatne informacije o analizah takih modelov je mogoče najti v Hocking (1985) ter Hochberg in Tamhane (1987).

Alternativno se evidentirajo neobdelani podatki, ki se v poročilu o študiji predstavijo kot plodnost (število iker) na ponovljeni vzorec za vsak dan. Izračunati je treba srednjo vrednost neobdelanih podatkov ponovljenega vzorca in nato uporabiti transformacijo s kvadratnim korenom. Izračunati je treba enofaktorsko analizo variance ANOVA za transformirane srednje vrednosti ponovljenega vzorca, ki ji sledijo Dunnettovi kontrasti. Morda bo koristno tudi, da se vizualno pregledajo podatki o plodnosti za vsako tretiranje in/ali ponovljeni vzorec z razsevnim grafikonom, ki prikazuje podatke skozi čas. To bo omogočilo neformalno oceno morebitnih učinkov skozi čas.

Vsi drugi biološki podatki

Statistične analize temeljijo na osnovni predpostavki, da bodo z izbiro pravilnega odmerka podatki monotoni. Za podatke se torej predpostavlja, da so monotoni, pri čemer se monotonost formalno oceni z uporabo linearnih in kvadratnih kontrastov. Če so podatki monotoni, se priporoča trendni test za mediane ponovljenih vzorcev po Jonckheere-Terpstraju (kot je priporočen v OECD 2006). Če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ne, se šteje, da podatki niso monotoni.

▼**M8**

Če podatki niso monotoni, zlasti zaradi zmanjšanega odziva enega ali dveh najbolj obremenjenih tretiranj, je treba razmisliti o cenzuriranju podatkovnega niza, tako da se analiza opravi brez navedenih tretiranj. To odločitev bo treba sprejeti na podlagi strokovne presoje in vseh razpoložljivih podatkov, zlasti podatkov, ki kažejo očitno toksičnost na navedenih ravneh tretiranja.

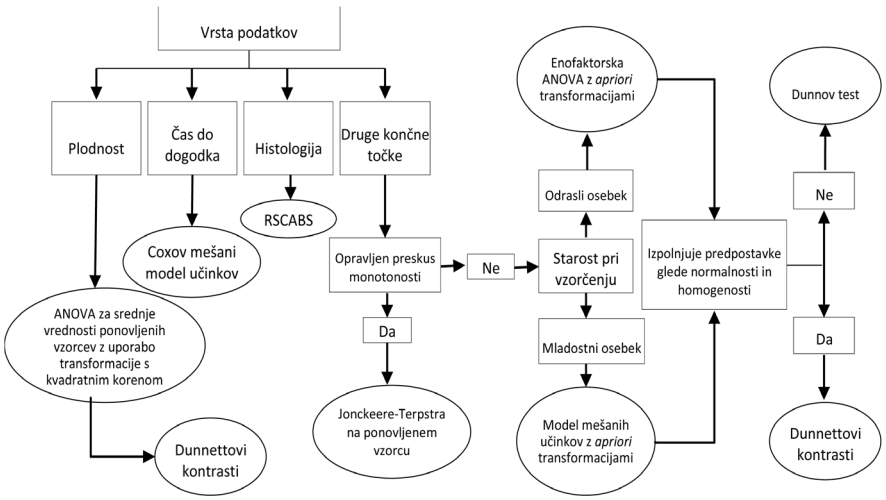
Za težo in dolžino se transformacije ne priporočajo, čeprav bodo občasno morda potrebne. Vendar pa se za podatke o vitelogeninu priporoča logaritemska transformacija; za podatke o SSZ (papile na predrepni plavuti) se priporoča kvadratnokorenska transformacija; arkus-sinus-kvadratnokorenska transformacija se priporoča za podatke o deležu izvalitve, stopnji preživetja, razmerju med spoloma in deležu fertilnih iker. Čas do izvalitve in čas do prvega drstenja je treba obravnavati kot podatke o času do dogodka, pri čemer se posamezni zarodki, ki se ne izvalijo v opredeljenem obdobju, ali ponovljeni vzorci, ki se nikoli ne drstijo, obravnavajo kot desno cenzurirani podatki. Čas do izvalitve je treba izračunati od srednjega dne izvalitve vsakega ponovljenega vzorca. Te končne točke je treba analizirati z uporabo mešanega Coxovega modela sorazmernih tveganj.

Biološki podatki iz vzorcev odraslih rib imajo eno meritev na ponovljeni vzorec, tj. obstaja ena XX- in ena XY-riba na ponovitveni akvarij. Zato je priporočljivo, da se za srednje vrednosti ponovljenega vzorca izvede enofaktorska ANOVA. Če sta predpostavki analize ANOVA (normalnost in homogenost variance, kot sta ocenjeni pri ostankih iz analize ANOVA s Shapiro-Wilkovim testom oziroma Levenovim testom) izpolnjeni, je treba uporabiti Dunnettove kontraste za določitev tretiranj, ki so se razlikovala od kontrole. Če pa predpostavki analize ANOVA nista izpolnjeni, je treba opraviti Dunnov test za določitev, katera tretiranja so se razlikovala od kontrole. Podoben postopek se priporoča za podatke, ki so v obliki odstotkov (plodnost, izvalitev in preživetje).

Biološki podatki iz vzorcev mladostnih osebkov imajo od 1 do 8 meritev na ponovljeni vzorec, tj. lahko obstaja spremenljivo število osebkov, ki prispevajo k srednji vrednosti ponovljenih vzorcev za vsak genotipski spol. Zato se priporoča uporaba mešanega modela ANOVA in nato Dunnettovih kontrastov, če sta bili predpostavki glede normalnosti in homogenosti variance izpolnjeni (pri ostankih iz mešane analize ANOVA). Če nista bili izpolnjeni, je potreben Dunnov test za določitev, katera tretiranja so se razlikovala od kontrole.

Slika 2

Diagram poteka za priporočene statistične postopke za analizo podatkov preskusa MEOGRT



▼**M8**

VIRI

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Pariz.

(2) Cameron, A. C., in Trivedi, P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking, R. R. (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg, Y., in Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53 PRESKUS RASTI IN RAZVOJA LIČINK DVOŽIVK (LAGDA)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 241 (2015). Preskus, s katerim se lahko ugotovijo in opredelijo škodljive posledice izpostavljenosti strupenim kemikalijam pri dvoživkah, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. V smernici OECD za preskušanje, ki se nanaša na preskus rasti in razvoja ličink dvoživk (LAGDA), je opisan preskus toksičnosti pri dvoživkah, v katerem se obravnavata rast in razvoj od oploditve do zgodnjega juvenilnega obdobja. Pri tem preskusu (ki običajno traja 16 tednov) se ocenijo zgodnji razvoj, preobrazba, preživetje, rast in delna spolna zrelost. Omogoča tudi meritev vrste drugih končnih točk za diagnostično oceno kemikalij, ki so domnevni endokrini motilci (endocrine disrupting chemicals, EDC), ali drugih vrst snovi, ki so strupene za razvoj in razmnoževanje. Metoda, opisana v tej preskusni metodi, je izpeljana iz validacijskega dela v zvezi z navadno krempljarko (*Xenopus laevis*), ki ga je opravila agencija ZDA za varstvo okolja (U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA)), pri čemer je bilo podporno delo opravljeno na Japonskem (1). Čeprav se lahko druge vrste dvoživk prilagodijo podobnemu preskusnemu protokolu za rast in razvoj, pri čemer je pomembna komponenta možnost določitve genetskega spola, se posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno opisane pri tej preskusni metodi, uporabljajo samo za *Xenopus laevis*.

2. Preskus LAGDA se pri dvoživkah uporablja kot preskus višje stopnje za pridobitev izčrpnejših podatkov o škodljivih učinkih glede na razmerje med koncentracijo in odzivom, ki so primerni za uporabo pri ugotavljanju in opredeljevanju nevarnosti ter oceni ekološkega tveganja. Preskus spada na raven 4 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters), na kateri preskusi *in vivo* zagotavljajo tudi podatke o škodljivih učinkih na končne točke, pomembne za endokrini sistem (2). Splošni načrt poskusa zajema izpostavljenost zarodkov *X. laevis* v 8–10. fazi po Nieuwkoopu in Faberju (NF) (3) najmanj štirim različnim koncentracijam preskusne kemikalije (običajno razdeljenim na najmanj pollogaritemske intervale) in kontrole do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli, z enim vmesnim podvzorcem v 62. fazi NF (≤ 45 po oploditvi; običajno približno 45 dni (dpo)). Pri vsaki preskusni koncentraciji so štirje ponovljeni vzorci, za kontrolo pa je osem ponovljenih vzorcev. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo (ob vmesnem podvzorcu in končnem vzorcu ob koncu preskusa), so tiste, ki kažejo na splošno toksičnost: smrtnost, nenormalno obnašanje in dejavnika rasti (dolžina in teža), ter končne točke, ki naj bi označevale posebno endokrino toksično delovanje, usmerjeno na fiziološke procese, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica. Glavni poudarek te metode je na morebitnih učinkih, pomembnih za populacijo (tj. škodljivih učinkih za preživetje, razvoj, rast in reproduktivni razvoj), za izračun koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) ali učinkovite koncentracije, ki povzroči x-odstotno spremembo (ECx) v izmerjeni končni točki. Opozoriti je sicer treba, da so pristopi z ECx redko primerni za tovrstne velike študije, pri katerih bo morda povečanje števila preskusnih koncentracij, da se omogoči določitev želene ECx, neizvedljivo. Opozoriti je treba tudi, da metoda ne zajema same reproduktivne faze. Pojmi, uporabljeni v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Zaradi omejenega števila preskušenih kemikalij in laboratorijev, vključenih v validacijo tega razmeroma kompleksnega preskusa, in ker do zdaj obnovljivost med laboratoriji ni bila dokumentirana s podatki iz poskusov, se predvideva, da bo smernica OECD za preskušanje 241 pregledana in po potrebi spremenjena glede na pridobljene izkušnje, ko bo na voljo zadostno število študij za ugotovitev učinka tega novega koncepta študije. LAGDA je pomemben preskus za obravnavanje morebitnih dejavnikov, ki prispevajo

▼M8

k zmanjševanju populacije dvoživk, pri katerem se ocenjujejo učinki izpostavljenosti kemikalijam med občutljivo fazo ličinke, v kateri lahko učinki na preživetje in razvoj, vključno z normalnim razvojem reproduktivnih organov, škodljivo vplivajo na populacije.

4. Preskus je zasnovan za odkrivanje učinkov na višjem nivoju, ki izhajajo iz endokrinih in neendokrinih mehanizmov, ter vključuje diagnostične končne točke, ki so delno specifične za ključne endokrine načine delovanja. Opozoriti je treba, da pred razvojem preskusa LAGDA ni obstajal noben validiran preskus, ki bi služil tej funkciji za dvoživke.

5. Pred začetkom preskusa je pomembno imeti informacije o fizikalno-kemijskih lastnostih preskusne kemikalije, zlasti da se omogoči priprava stabilnih raztopin kemikalije. Prav tako je treba imeti ustrezno občutljivo analitsko metodo za preverjanje koncentracij preskusne kemikalije. Za preskus, ki traja približno 16 tednov, je potrebnih skupaj 480 živali, tj. zarodkov *X. laevis* (ali 640 zarodkov, če se uporabi kontrola s topilom), da se zagotovi zadostna moč preskusa za oceno končnih točk, pomembnih za populacijo, kot so rast, razvoj in spolna zrelost.

6. Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba preučiti, ali bo dala sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen. Poleg tega se s tem preskusom plodnost ne ocenjuje neposredno, zato morda ne bo uporaben na poznejši stopnji po ravni 4 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

ZNANSTVENA PODLAGA ZA PRESKUSNO METODO

7. Veliko sedanjega znanja o biologiji dvoživk je bilo pridobljenega z uporabo laboratorijske modelne vrste *X. laevis*. Ta vrsta se lahko rutinsko goji v laboratoriju, ovulacija se lahko sproži z uporabo humanega horionskega gonadotropina (hCG), staleži živali pa so na voljo pri komercialnih rejcih.

8. Kot pri vseh vretenčarjih razmnoževanje pri dvoživkah poteka pod nadzorom osi hipotalamus–hipofiza–spolne žleze (HPG) (4). Posredniki v tem endokrinem sistemu so estrogeni in androgeni, ki narekujejo razvoj in fiziologijo spolno dimorfnih tkiv. V življenjskem ciklu dvoživk obstajajo tri ločene faze, ko je ta os še posebno aktivna: (1) diferenciacija spolnih žlez med razvojem ličinke, (2) razvoj sekundarnih spolnih značilnosti in zorenje spolnih žlez v juvenilni fazi ter (3) funkcionalno razmnoževanje odraslih osebkov. V vsaki od teh treh razvojnih faz se lahko pojavijo endokrine motnje, ki jih povzročajo nekatere kemikalije, kot so estrogeni in androgeni, ki nazadnje privedejo do izgube reproduktivne sposobnosti organizmov.

9. Spolne žleze se začnejo razvijati v 43. fazi NF, ko se prvič razvije bipotencialni genitalni greben. Diferenciacija spolnih žlez se začne v 52. fazi NF, ko primordialne zarodne celice bodisi migrirajo v mozgovno tkivo (samci) bodisi ostanejo v kortikalni regiji (samice) razvijajočih se spolnih žlez (3). O dovzetnosti tega procesa spolne diferenciacije spolnih žlez za kemijske spremembe pri *Xenopus* se je prvič poročalo v 50. letih prejšnjega stoletja

▼M8

(5) (6). Izpostavljenost paglavcev estradiolu v tem obdobju diferenciacije spolnih žlez privede do zamenjave spola pri samcih, ki so v odrasli dobi popolnoma funkcionalne samice (7) (8). Mogoča je tudi zamenjava funkcionalnega spola samic v samce, o kateri se je poročalo po vsaditvi tkiva testisov v paglavce (9). Čeprav izpostavljenost inhibitorju aromataze povzroči zamenjavo funkcionalnega spola tudi pri *X. tropicalis* (10), pa ni bilo dokazano, da se to zgodi pri *X. laevis*. V preteklosti so se učinki strupenih snovi na diferenciacijo spolnih žlez ocenjevali s histološkim pregledom spolnih žlez ob preobrazbi, tako da se je zamenjava spola lahko določila le z analizo razmerij med spoloma. Do nedavnega ni bilo sredstev za neposredno določitev genetskega spola *Xenopus*. Vendar pa je zaradi nedavne določitve s spolom povezanih označevalcev pri *X. laevis* mogoče določiti genetski spol, kar omogoča neposredno opredelitev živali z zamenjanim spolom (11).

10. Pri samcih se razvoj juvenilnih osebkov nadaljuje z zvišanjem ravni testosterona v krvi, kar sovpada z razvojem sekundarnih spolnih značilnosti in testisov. Pri samicah jajčniki proizvajajo estradiol, kar povzroči pojav vitelogenina (VTG) v plazmi, vitelogeninskih oocitov v jajčniku in razvoj jajcevodov (12). Jajcevodi so sekundarna spolna značilnost pri samicah in delujejo pri zorenju oocitov med razmnoževanjem. Ko oociti potujejo po jajcevodu in se zberejo v jajčni vrečki, pripravljeni za oploditev, je njihova zunanjost obdana s sluzastim ovojem. Zdi se, da razvoj jajcevodov regulirajo estrogeni, saj je povezan z ravnmi estradiola v krvi pri *X. laevis* (13) in *X. tropicalis* (12). Obstajajo poročila o razvoju jajcevodov pri samcih po izpostavljenosti poliklоriranim bifenilom (14) in 4-terc-oktilfenolu (15).

NAČELO PRESKUSA

11. Načrt preskusa zajema izpostavljenost zarodkov *X. laevis* v 8.–10. fazi NF prek vodne poti štirim različnim koncentracijam preskusne kemikalije in kontrole do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli, z enim vmesnim podvzorcem v 62. fazi NF. Čeprav je mogoče visoko hidrofobne kemikalije odmerjati tudi prek hrane, je bilo do danes pridobljenih malo izkušenj z uporabo te poti izpostavljenosti v tem preskusu. Pri vsaki preskusni koncentraciji so štirje ponovljeni vzorci, pri vsaki uporabljeni kontroli pa je osem ponovljenih vzorcev. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo, so tiste, ki kažejo na splošno toksičnost (tj. smrtnost, nenormalno obnašanje in dejavnika rasti (dolžina in teža)), ter končne točke, ki naj bi označevale posebno endokrino toksično delovanje, usmerjeno na fiziološke procese, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica (tj. histopatologija ščitnice, histopatologija spolnih žlez in spolnih vodov, nenormalni razvoj, vitelogenin v plazmi (neobvezno) in razmerja med genotipskim/fenotipskim spolom).

MERILA ZA VELJAVNOST PRESKUSA

12. Uporabljajo se naslednja merila za veljavnost preskusa:

— koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom ≥ 40 % nasičenosti z zrakom;

▼M8

— temperatura vode mora biti v območju 21 ± 1 °C, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji pa ne smejo presegati 1,0 °C;

— pH preskusne raztopine je treba vzdrževati med 6,5 in 8,5, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji pa ne smejo presegati 0,5;

— na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti;

— smrtnost v obdobju izpostavljenosti mora biti ≤ 20-odstotna v vsakem ponovljenem vzorcu v kontrolah;

— ≥ 70-odstotna viabilnost v mrestu, izbranem za začetek študije;

— srednji čas do 62. faze NF v kontrolah mora biti ≤ 45 dni;

— srednja teža preskusnih organizmov pri 62. fazi NF in ob koncu preskusa v kontrolah in kontrolah s topilom (če se uporabijo) mora biti 1,0 ± 0,2 g oziroma 11,5 ± 3 g.

13. Čeprav to ni merilo za veljavnost, je priporočljivo, da so za analizo na voljo vsaj tri ravni tretiranja s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci. Čezmerna smrtnost, ki ogroža tretiranje, je opredeljena kot > 4 smrtni primeri (> 20 %) v dveh ali več ponovljenih vzorcih, ki jih ni mogoče pojasniti s tehnično napako. Za analizo morajo biti na voljo vsaj tri ravni tretiranja brez očitne toksičnosti. Znaki očitne toksičnosti lahko med drugim vključujejo lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje, morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije in edeme v trebušni votlini.

14. Če je ugotovljeno odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost rezultatov preskusa ter ta odstopanja in razmisleke vključiti v poročilo o preskusu.

OPIS METOD

Oprema

15. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

(a) naprave za nadzor temperature (npr. grelniki ali hladilniki (prilagodljivi do 21 °C ± 1 °C));

▼M8

(b) termometer;

(c) binokularni stereomikroskop in pripomočki za seciranje;

(d) digitalni fotoaparat z ločljivostjo vsaj 4 milijone slikovnih točk in funkcijo mikro (po potrebi);

(e) analitska tehtnica, s katero je mogoče meriti na 0,001 mg ali 1 μg natančno;

(f) merilnik raztopljenega kisika in merilnik vrednosti pH;

(g) merilnik jakosti svetlobe, s katerim je mogoče meriti v luksih.

Voda

Vir in kakovost

16. Uporabi se lahko vsaka lokalno razpoložljiva voda za redčenje (npr. izvirska voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem), ki omogoča normalno rast in razvoj *X. laevis*, na voljo pa morajo biti dokazi o normalni rasti v tej vodi. Ker se lahko kakovost lokalne vode med posameznimi območji bistveno razlikuje, je treba izvesti analizo kakovosti vode, zlasti če niso na voljo podatki iz preteklih preskusov o uporabi vode za gojenje ličink dvoživk. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg_2 Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti pred začetkom preskusa in/ali na primer vsakih šest mesecev, kadar se ve, da je kakovost vode za redčenje relativno konstantna. Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2.

Koncentracija jodida v preskusni vodi

17. Da lahko ščitnična žleza sintetizira ščitnične hormone za podporo normalni preobrazbi, mora imeti ličinka na voljo dovolj jodida v vodi in hrani. Trenutno ni empiričnih smernic za najmanjše koncentracije jodida v hrani ali vodi za zagotovitev pravilnega razvoja. Vendar lahko razpoložljivost jodida vpliva na odzivnost ščitničnega sistema na snovi, ki vplivajo na ščitnico, in spremeni bazalno aktivnost ščitnične žleze, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov histopatologije ščitnice. Na podlagi predhodnega dela je bilo dokazano, da je preskus uspešen, kadar so koncentracije jodida (I^{-}) v vodi za redčenje med 0,5 in 10 μg/l. Najprimernejša najmanjša koncentracija jodida v vodi za redčenje med celotnim preskusom je 0,5 μg/l (dodan kot natrijeva ali kalijeva sol). Če je preskusna voda modelna razredčevalna voda iz deionizirane vode, je treba dodati najmanjšo koncentracija joda, tj. 0,5 μg/l. Izmerjene koncentracije jodida v preskusni vodi (tj. vodi za redčenje) in dodajanje jodovih ali drugih soli v preskusno vodo (če se uporabi) je treba navesti v poročilu. Vsebnost joda se lahko izmeri ne le v preskusni vodi, ampak tudi v hrani.

Sistem izpostavljenosti

18. Preskus je bil razvit z uporabo pretočnega sistema za redčenje. Sestavni deli sistema, ki pridejo v stik z vodo, morajo biti iz stekla, nerjavnega jekla in/ali drugih kemijsko inertnih materialov. Posode za izpostavljanje morajo biti akvariji iz stekla ali nerjavnega jekla, uporabna prostornina akvarija pa mora biti med 4,0 in 10,0 l (najmanjša globina vode med 10 in 15 cm). Sistem mora podpirati vse koncentracije izpostavljenosti in kontrolo ter po potrebi kontrolo s topilom, s štirimi ponovljenimi vzorci na tretiranje in osmimi v kontrolah. Pretok v posameznem akvariju mora biti konstanten zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji. Priporočljivo je, da so pretoki ustrezni (npr. najmanj 5 izmenjav v akvarijih na dan), da se prepreči zmanjšanje koncentracije kemikalije zaradi metabolizma preskusnih organizmov in vodnih mikroorganizmov, prisotnih v akvarijih,

▼M8

ali abiotskih poti razkroja (hidroliza, fitoliza) ali disipacije (izhlapevanje, sorpcija). Tretirane akvarije je treba naključno dodeliti na položaj v sistemu izpostavljenosti, da se zmanjšajo potencialni učinki zaradi položaja, vključno z majhnimi razlikami v temperaturi, jakosti svetlobe itd. Več informacij o vzpostavitvi pretočnega sistema izpostavljenosti je na voljo v Standardnih smernicah ASTM za izvajanje preskusov akutne toksičnosti na preskusnih materialih z ribami, velikimi vretenčarji in dvoživkami (16).

Dodajanje kemikalije: priprava preskusnih raztopin

19. Za vnos preskusnih raztopin v sistem izpostavljenosti je treba osnovno raztopino preskusne kemikalije v sistem izpostavljenosti odmerjati z ustrezno črpalko ali drugo napravo. Pretok osnovne raztopine je treba pred začetkom izpostavljenosti umeriti v skladu z analitsko potrditvijo preskusnih raztopin in ga med preskusom redno volumetrično preverjati. Preskusno raztopino v vsaki komori je treba obnavljati z najmanj 5 izmenjavami količine/dan.

20. Metoda, ki se uporablja za uvajanje preskusne kemikalije v sistem, se lahko razlikuje glede na njene fizikalno-kemijske lastnosti. Zato je treba pred preskusom pridobiti osnovne informacije o kemikaliji, ki so ustrezne za določitev njene preverljivosti. Med uporabne informacije o specifičnih lastnostih preskusne kemikalije spadajo strukturna formula, molekulska masa, čistost, obstojnost v vodi in na svetlobi, pK_a in K_{ow}, topnost v vodi (po možnosti v preskusnem mediju), parni tlak in rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (preskusna metoda C.4 (17) ali C.29 (18)). Topnost in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so verjetne izgube zaradi izhlapevanja preskusne kemikalije. O izvedbi tega preskusa brez zgoraj navedenih informacij je treba skrbno razmislili, saj bo načrt študije odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, brez teh podatkov pa bo morda rezultate preskusa težko razložiti ali pa bodo brez pomena. Na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo preskusne kemikalije v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo zaznavnosti. Vodotopne preskusne kemikalije se lahko raztopijo v alikvotih vode za redčenje pri koncentraciji, ki omogoča dodajanje pri ciljni preskusni koncentraciji v pretočnem sistemu. Za kemikalije, ki so pri sobni temperaturi tekoče ali trdne in zmerno topne v vodi, bodo morda potrebne saturacijske kolone (npr. iz steklene volne) tekočina: tekočina ali tekočina: trdna snov (19). Čeprav je mogoče zelo hidrofobne preskusne kemikalije odmerjati tudi prek hrane, je bilo pridobljenih malo izkušenj z uporabo te poti izpostavljenosti v tem preskusu.

21. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z mehanskimi sredstvi (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo saturacijske kolone/sistemi ali metode pasivnega odmerjanja (20). Zaželena je uporaba preskusnega sistema brez pomožnega topila; vendar imajo različne preskusne kemikalije različne fizikalno-kemijske lastnosti, zaradi katerih bodo verjetno potrebni različni pristopi za pripravo vode za izpostavljenost kemikalijam. Čim bolj si je treba prizadevati za neuporabo topil ali nosilcev, ker: (1) lahko nekatera topila povzročijo toksičnost in/ali neželene ali nepričakovane

▼M8

odzive, (2) lahko preskušanje kemikalij nad njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev učinkovitih koncentracij, (3) lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobno dejavnostjo, kar lahko vpliva na okoljske pogoje in zmožnost vzdrževanja koncentracij izpostavljenosti, ter (4) ob neobstoju preteklih podatkov, ki kažejo, da topilo ne vpliva na rezultat študije, uporaba topil zahteva kontrolno tretiranje s topilom, kar ima precejšnje posledice za dobrobit živali, saj so za izvedbo preskusa potrebne dodatne živali. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (21). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti preskusne kemikalije in razpoložljivosti preteklih kontrolnih podatkov o topilu. Ob neobstoju preteklih podatkov je treba primernost topila določiti pred izvedbo dokončne študije. Če se uporabi topila ni mogoče izogniti in se pojavi mikrobna dejavnost (razvoj biofilma), se priporoča evidentiranje/sporočanje razvoja biofilma po akvarijih (vsaj tedensko) med celotnim preskusom. V idealnih razmerah bi morala biti koncentracija topila konstantna v kontroli s topilom in vseh preskusnih tretiranjih. Če koncentracija topila ni konstantna, je treba v kontroli s topilom uporabiti najvišjo koncentracijo topila v preskusnem tretiranju. Kadar se uporabi topilo kot nosilec, najvišje koncentracije topila ne smejo presegati 100 µl/l ali 100 mg/l (21), priporočljivo pa je tudi, da koncentracija topila ostane čim nižja (npr. ≤ 20 µl/l), da bi se izognili možnim učinkom topila na izmerjene končne točke (22).

Preskusne živali

Preskusna vrsta

22. Preskusna vrsta je *X. laevis,* ker: (1) se rutinsko goji v laboratorijih po vsem svetu, (2) se lahko enostavno pridobi prek komercialnih dobaviteljev in (3) je mogoče pri njej določiti genetski spol.

Oskrba odraslih osebkov in razmnoževanje

23. Ustrezna oskrba in razmnoževanje *X. laevis* sta opisana s standardnimi smernicami (23). Nastanitev in skrb za *X. laevis* je opisal tudi Read (24). Za začetek razmnoževanja se v tri do pet parov odraslih samic in samcev intraperitonealno injicira humani horionski gonadotropin (hCG). V samice in samce se injicira npr. približno 800–1 000 IU oziroma 500–800 IU hCG, raztopljenega v 0,6–0,9-odstotni solni raztopini (npr. Ringerjeva raztopina za žabe, fiziološka raztopina za uporabo pri dvoživkah). Injekcijski volumen mora biti približno 10 µl/g telesne teže (~ 1 000 µl). Pari, pri katerih se je začelo razmnoževanje, so nato v velikih akvarijih v okolju, ki jih ne ovira, in v statičnih pogojih, da se spodbuja ampleksus. Dno vsakega akvarija za razmnoževanje mora imeti navidezno dno iz mreže iz nerjavnega jekla (npr. 1,25 cm velike odprtine), ki omogoča prehajanje jajčec na dno akvarija. Žabe, v katere je bil hCG injiciran pozno popoldne, običajno odložijo večino jajčec do sredine naslednjega dopoldneva. Ko je odloženih in oplojenih dovolj jajčec, je treba odrasle osebke odstraniti iz akvarijev za razmnoževanje. Jajčeca se nato zberejo, sluzast ovoj pa se odstrani s tretiranjem z

▼M8

L-cisteinom (23). Pripraviti je treba 2-odstotno L-cisteinsko raztopino, vrednost pH pa prilagoditi na 8,1 z 1 M NaOH. Ta raztopina s temperaturo 21 °C se doda v 500-mililitrsko erlenmajerico, ki vsebuje jajčeca iz enega samega mresta, nato pa se eno do dve minuti nežno meša in temeljito od 6- do 8-krat spere z vodo za gojenje s temperaturo 21 °C. Jajčeca se nato prenesejo v kristalizirko in ugotovi se > 70-odstotna viabilnost z minimalnimi nenormalnostmi pri zarodkih, pri katerih se delijo celice.

NAČRT PRESKUSA

Preskusne koncentracije

24. Priporoča se uporaba najmanj štirih preskusnih koncentracij in ustreznih kontrol (vključno s kontrolami s topilom, če je to potrebno). Na splošno se priporoča razmik med koncentracijami (faktor razmika), ki ne presega 3,2.

25. Za namene tega preskusa je treba pri določitvi najvišje preskusne koncentracije, kolikor je mogoče, uporabiti rezultate iz obstoječih študij dvoživk, da se tako preprečijo očitno strupene koncentracije. K določitvi te koncentracije lahko prispevajo informacije iz, na primer, kvantitativnih razmerij med strukturo in aktivnostjo, navzkrižna branja in podatki iz obstoječih študij dvoživk, kot so preskus preobrazbe dvoživk, preskusna metoda C.38 (25) in preskus teratogeneze embriov žab – *Xenopus* (23) in/ali preskusi na ribah, kot so preskusne metode C.48, C.41 in C.49 (26) (27) (28). Pred izvedbo preskusa LAGDA se lahko izvede poskus za določanje območja. Priporočljivo je, da se izpostavljenost za določanje območja začne v 24 urah od oploditve in nadaljuje od 7 do 14 dni (ali po potrebi več), preskusne koncentracije pa se določijo tako, da intervali med njimi niso večji od faktorja 10. Rezultate poskusa za določanje območja je treba uporabiti za določitev najvišje preskusne koncentracije v preskusu LAGDA. Upoštevajte, da se lahko, če je treba uporabiti topilo, v okviru študije za določanje območja določi tudi primernost topila (tj. ali lahko vpliva na rezultat študije).

Ponovljeni vzorci v okviru tretiranih skupin in kontrol

26. Uporabiti je treba najmanj štiri ponovitvene akvarije na preskusno koncentracijo in najmanj osem ponovljenih vzorcev za kontrole (in kontrolo s topilom, če je potrebna) (tj. da se zagotovi ustrezna statistična moč, mora biti ponovljenih vzorcev v kontroli in morebitni kontroli s topilom dvakrat toliko kot ponovljenih vzorcev vsake tretirane skupine). Vsak ponovljeni vzorec lahko vsebuje največ 20 živali. Najmanjše število obdelanih živali bi bilo 15 (5 za podvzorec pri 62. fazi NF in 10 mladih osebkov). Vendar se v vsak ponovljeni vzorec dodajo dodatne živali, da se upošteva možnost pogina, pri čemer se vzdržuje kritično število 15.

POSTOPEK

Pregled preskusa

27. Preskus se začne z novoodloženimi zarodki (8.–10. faza NF) in nadaljuje do razvoja mladih osebkov. Živali se pregledujejo dnevno zaradi pogina in kakršnih koli znakov nenormalnega obnašanja. V 62. fazi NF se vzame podvzorec ličink (do 5 živali na ponovljeni vzorec) in preučijo se različne končne točke (preglednica 1). Ko vse živali dosežejo 66. fazo NF, tj. končano preobrazbo (ali 70 dni po začetku preskusa, odvisno od tega, kaj

▼M8

je prej), se izvede naključna izločitev (vendar brez podvzorčenja), da se zmanjša število živali (10 na akvarij) (glej odstavek 43), preostale živali pa ostanejo izpostavljene do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli. Ob koncu preskusa (vzorčenje mladih osebkov) se izvedejo dodatne meritve (preglednica 1).

Pogoji izpostavljenosti

28. Celotni povzetek parametrov preskusa je v Dodatku 3. V obdobju izpostavljenosti je treba vsak dan meriti raztopljeni kisik, temperaturo in vrednost pH preskusnih raztopin. Prevodnost, alkalnost in trdota se merijo enkrat mesečno. Kar zadeva temperaturo vode preskusnih raztopin, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji (v enem dnevu) ne smejo presegati 1,0 °C. Tudi pri pH preskusnih raztopin razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji ne smejo presegati 0,5.

29. Izpostavljeni akvariji se lahko vsak dan očistijo z izsesavanjem, da se odstranijo nezaužita hrana in odpadki, pri čemer je treba paziti, da ne pride do navzkrižne kontaminacije akvarijev. Čim bolj je treba zmanjšati stres in travmo za živali, zlasti med seljenjem, čiščenjem akvarija in ravnanjem z njimi. Preprečiti je treba stresne razmere/dejavnosti, kot so glasen in/ali nenehen hrup, trkanje po akvariju, tresljaji v akvariju.

Trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji

30. Izpostavljenost se začne z novoodloženimi zarodki (8.–10. faza NF) in nadaljuje do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF (≤ 45 dni od začetka preskusa) v kontrolni skupini. Na splošno preskus LAGDA traja 16 tednov (največ 17 tednov).

Začetek preskusa

31. Za starše, ki se uporabijo za začetek preskusa, je treba predhodno dokazati, da proizvajajo potomce, ki jim je mogoče določiti genetski spol (Dodatek 5). Po mrestenju odraslih osebkov se zarodki odvzamejo, tretirajo s cisteinom, da se odstrani sluzasti ovoj, in presejejo za viabilnost (23). Tretiranje s cisteinom omogoča ravnanje z zarodki med presejalnim pregledom, ne da bi se ti prijemali na površine. Presejalni pregled se opravi pod stereomikroskopom z ustrezno veliko kapalko, da se odstranijo neviabilni zarodki. Zaželeno je, da se za preskus uporabi en sam mrest z več kot 70-odstotno viabilnostjo. Zarodki v 8.–10. fazi NF se naključno razdelijo v tretirane akvarije za izpostavljenost, ki vsebujejo ustrezno količino vode za redčenje, dokler ni v vsakem akvariju po 20 zarodkov. Med tem prenosom je treba z zarodki ravnati zelo previdno, da se čim bolj zmanjša stres zaradi prenosa in preprečijo poškodbe. V 96 urah po oploditvi se morajo paglavci premakniti navzgor po vodnem stolpcu in se začeti prijemati na stranice akvarija.

Način hranjenja

32. Hrana in stopnja hranjenja se v različnih življenjskih fazah *X. laevis* razlikujeta in sta zelo pomemben vidik protokola LAGDA. Čezmerno hranjenje v fazi ličink običajno privede do povečane pojavnosti in resnosti skolioze (Dodatek 8), zato se mu je treba izogibati. Po drugi strani nezadostno hranjenje v fazi ličink privede do zelo različnih hitrosti razvoja med kontrolami, kar lahko ogrozi statistično moč ali vpliva na rezultate preskusa. V

▼M8

Dodatku 4 sta navedena priporočena prehrana in način hranjenja ličink in mladih osebkov *X. laevis* v pretočnih razmerah, vendar pa so dopustne druge možnosti, če preskusni organizmi zadovoljivo rastejo in se razvijajo. Opozoriti je treba, da če se merijo končne točke, specifične za endokrini sistem, mora biti hrana brez endokrinih aktivnih snovi, kot je sojina moka.

Hranjenje ličink

33. Priporočena prehrana ličink je sestavljena iz začetne hrane za postrvi, ploščic alg *spirulina* in čipsa za zlate ribice (npr. kosmiči TetraFin®, Tetra, Nemčija), zmešanih skupaj v vodi za gojenje (ali redčenje). Ta mešanica se daje trikrat dnevno ob delovnikih in enkrat dnevno ob koncu tedna. Paglavci se od 8. dne po oploditvi hranijo tudi s 24-ur starimi živimi navpliji solinskih rakcev vrste *Artemia*, in sicer dvakrat dnevno ob delovnikih in enkrat dnevno ob koncu tedna. Hranjenje ličink, ki mora biti skladno v vseh preskusnih posodah, mora omogočati ustrezno rast in razvoj preskusnih živali, da se zagotovita obnovljivost in prenosljivost rezultatov preskusa: (1) srednji čas do 62. faze NF v kontrolah mora biti ≤ 45 dni in (2) pri 62. fazi NF v kontrolah je priporočena srednja teža v območju 1,0 ± 0,2 g.

Hranjenje mladih osebkov

34. Ko je preobrazba končana, je prehrana sestavljena iz visokokakovostne toneče hrane za žabe, npr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Florida, ZDA) (Dodatek 4). Za žabice (zgodnje mlade osebke) se peleti na hitro zmeljejo v kavnem mlinčku ali mešalniku ali zdrobijo v možnarju, da se zmanjšajo. Ko so mladi osebki dovolj veliki, da lahko zaužijejo cele pelete, mletje ali drobljenje ni več potrebno. Živali je treba hraniti enkrat dnevno. Tudi hranjenje mladih osebkov mora omogočati ustrezno rast in razvoj organizmov: pri kontrolnih mladih osebkih je ob koncu preskusa priporočena srednja teža v območju 11,5 ± 3 g.

Analitična kemija

35. Pred začetkom preskusa je treba oceniti stabilnost preskusne kemikalije (npr. topnost, razgradljivost in hlapnost) in določiti vse potrebne analitske metode, na primer na podlagi obstoječih informacij ali znanja. Pri odmerjanju prek vode za redčenje je priporočeno, da se preskusne raztopine iz vsakega ponovitvenega akvarija analizirajo pred začetkom preskusa, da se preveri učinkovitost sistema. V obdobju izpostavljenosti se koncentracije preskusne kemikalije določajo v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsak teden za vsaj en ponovljeni vzorec v vsaki tretirani skupini, pri čemer se vsak teden rotira med ponovljenimi vzorci iste tretirane skupine. Priporočljivo je, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih. Prav tako je treba tudi koeficient variacije (CV) izmerjenih preskusnih koncentracij v celotnem obdobju preskusa v okviru tretiranja pri vsaki koncentraciji vzdrževati pri največ 20 %. Če izmerjene koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije (kadar se na primer preskušajo zelo biorazgradljive ali adsorptivne kemikalije), je treba koncentracije z učinkom pri pretočnih preskusih določiti in izraziti glede na aritmetično sredino koncentracij.

▼M8

36. Pretoke vode za redčenje in osnovne raztopine je treba med celotnim trajanjem izpostavljenosti preverjati v ustreznih časovnih razmikih (npr. trikrat tedensko). V primeru kemikalij, ki jih pri nekaterih ali vseh nominalnih koncentracijah ni mogoče zaznati (npr. zaradi hitrega razkroja ali adsorpcije v preskusnih posodah ali opaznega kopičenja kemikalije v telesih izpostavljenih živali), je priporočljivo v vsaki komori prilagoditi stopnjo izmenjave preskusne raztopine, da bi preskusne koncentracije ostale čim bolj konstantne.

Opažanja in meritve končnih točk

37. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo, so tiste, ki kažejo na toksičnost, vključno s smrtnostjo, nenormalnim obnašanjem, kot so klinični znaki bolezni in/ali splošne toksičnosti, in dejavnika rasti (dolžina in teža)), ter patološke končne točke, ki lahko ustrezajo tako splošni toksičnosti kot tudi endokrinemu delovanju, usmerjenemu na poti, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica. Poleg tega se lahko ob koncu preskusa neobvezno izmeri koncentracija VTG v plazmi. Meritev VTG lahko koristi pri razumevanju rezultatov študije v okviru endokrinih mehanizmov za domnevne EDC. Končne točke in časovni okvir meritev so povzeti v preglednici 1.

Preglednica 1

Pregled končnih točk preskusa LAGDA

Končne točke (*)	Dnevno	Vmesno vzorčenje (vzorčenje ličink)	Ob koncu preskusa (vzorčenje mladih osebkov)
Smrtnost in anomalije	X		
Čas do 62. faze NF		X	
Histo(pato)logija (ščitnične žleze)		X	
Morfometrija (rast po teži in dolžini)		X	X
Jetrno-somatski indeks (LSI)			X
Razmerje med genetskim/fenotipskim spolom			X
Histopatologija (spolne žleze, spolni vodi, ledvice in jetra)			X
Vitelogenin (VTG) (neobvezno)			X

(*) Vse končne točke se statistično analizirajo.

Smrtnost in dnevna opažanja

38. Vsak dan je treba pregledati, ali so v preskusnih akvarijih mrtve živali, in evidentirati pogine za posamezne akvarije. Mrtve živali je treba takoj, ko so opažene, odstraniti iz preskusnega akvarija. Razvojno fazo mrtvih živali je treba uvrstiti pred 58. fazo NF (pred pojavom sprednjih krakov), med 58. in 62. fazo NF, med 63. in 66. fazo NF (med 62. fazo NF in popolno resorpcijo repa) ali po 66. fazi NF (po fazi ličinke). Stopnje smrtnosti, ki presegajo

▼M8

20 %, lahko kažejo neustrezne preskusne pogoje ali očitno toksične učinke preskusne kemikalije. Živali so za pogine, ki jih ne povzroča kemikalija, običajno najbolj občutljive v prvih nekaj dneh razvoja po mrestenju in med metamorfoznim klimaksom. Taka smrtnost je lahko razvidna iz kontrolnih podatkov.

39. Poleg tega je treba evidentirati vsako opaženo nenormalno obnašanje, zelo vidne deformnosti (npr. skoliozo) ali lezije. Opažene primere skolioze je treba prešteti (pojavnost) in oceniti glede na resnost (npr. neopazna – NO, minimalna – 1, zmerna – 2, huda – 3; Dodatek 8). Prizadevati si je treba za zagotovitev, da je prevalenca zmerne in hude skolioze ves čas študije omejena (npr. pod 10 % v kontrolah), čeprav večja prevalenca nenormalnosti v kontrolah ni nujno razlog za ustavitev preskusa. Za normalno obnašanje ličink je značilno, da plavajo v vodnem stolpcu z repom nad glavo, redno ritmično udarjajo z repno plavutjo, redno prihajajo na površino, premikajo škržni poklopec in se odzivajo na dražljaje. Nenormalno obnašanje bi na primer vključevalo lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje. Pri živalih po preobrazbi je treba poleg zgoraj navedenega nenormalnega obnašanja evidentirati tudi velike razlike pri porabi hrane med tretiranji. Velike deformnosti in lezije lahko med drugim vključujejo morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije, edeme v trebušni votlini in bakterijske ali glivične okužbe. Pojav lezij na glavi mladih osebkov, takoj za nosnicami, je lahko znak nezadostne stopnje vlage. Te ugotovitve so kvalitativne, pri čemer jih je treba obravnavati podobno kot klinične znake bolezni/stresa in jih primerjati s kontrolnimi živalmi. Če je stopnja pojavnosti v izpostavljenih akvarijih večja kot v kontrolnih akvarijih, jo je treba obravnavati kot dokaz očitne toksičnosti.

Podvzorčenje ličink

Pregled podvzorčenja ličink

40. Paglavce, ki so dosegli 62. fazo NF, je treba odstraniti iz akvarijev in jih bodisi vzorčiti ali preseliti v naslednji del izpostavljenosti v novem akvariju bodisi fizično ločiti od preostalih paglavcev v istem akvariju s predelnim elementom. Paglavci se preverjajo vsak dan, pri čemer se evidentira dan študije, ko posamezni paglavec doseže 62. fazo NF. Odločilna značilnost, ki se uporabi pri tej oceni, je oblika glave. Ko se velikost glave zmanjša, tako da je vizualno približno enako široka kot trup paglavca, sprednja kraka pa sta v višini sredine srca, se za posamezni osebek šteje, da je dosegel 62. fazo NF.

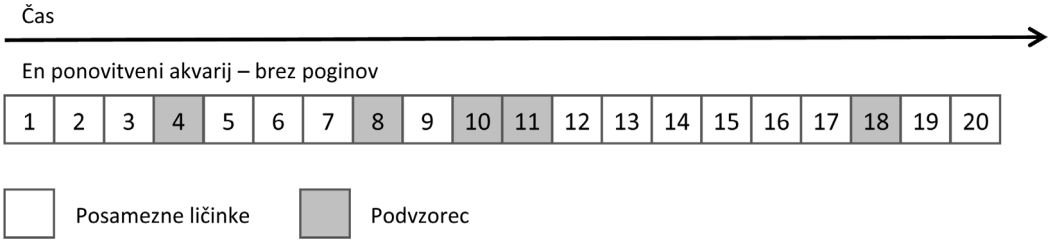
41. Cilj je, da se vzorči skupaj pet paglavcev v 62. fazi NF na ponovitveni akvarij. Vzorčenje mora biti popolnoma naključno, vendar se je treba o njem odločiti predhodno. Hipotetični primer ponovitvenega akvarija je prikazan na **sliki 1**. Če je v posameznem akvariju 20 preživelih paglavcev, ko prvi doseže 62. fazo NF, je treba izbrati pet naključnih številk med 1 in 20. Paglavec #1 je prvi osebek, ki je dosegel 62. fazo NF, paglavec #20 pa osebek v akvariju, ki jo je dosegel zadnji. Podobno je treba izbrati pet naključnih številk med 1 in 18, če je v akvariju 18 preživelih ličink. To je treba opraviti za vsak ponovitveni akvarij, ko prvi osebek v preskusu doseže 62. fazo NF. V primeru poginov med vzorčenjem med 62. fazo NF je treba preostale vzorce naključno prerazporediti glede na to, koliko ličnik je ostalo < 62. faze NF in koliko vzorcev je še potrebnih za skupaj pet vzorcev iz zadevnega ponovitvenega akvarija. Na dan, ko paglavec doseže 62. fazo NF, se upošteva pripravljeni načrt vzorčenja, da se določi, ali je treba ta osebek vzorčiti ali fizično ločiti od preostalih paglavcev za nadaljnjo izpostavljenost.

▼**M8**

V predstavljenem primeru (slika 1) je prvi osebek, ki doseže 62. fazo NF (tj. okence #1), fizično ločen od drugih ličink in še naprej izpostavljen, poleg tega se evidentira dan študije, ko je ta osebek dosegel 62. fazo NF. Nadalje se osebka #2 in #3 obravnavata enako kot osebek #1, osebek #4 pa se nato vzorči za rast in histologijo ščitnice (glede na ta primer). Ta postopek se nadaljuje, dokler se 20. osebek bodisi pridruži preostalim osebkom po 62. fazi NF bodisi vzorči. Z uporabljenim naključnim postopkom je treba vsakemu organizmu, ki se preskuša, zagotoviti enako verjetnost izbire. To je mogoče doseči z uporabo katere koli metode naključnega vzorca, vendar je treba pri tem na neki točki v obdobju podvzorčenja pri 62. fazi NF tudi ujeti vsakega paglavca.

Slika 1

Hipotetični primer načrta vzorčenja pri 62. fazi NF za en ponovitveni akvarij



42. Pri podvzorčenju ličink so pridobljene končne točke: (1) čas do 62. faze NF (tj. število dni med oploditvijo in 62. fazo NF), (2) zunanje nenormalnosti, (3) morfometrija (npr. teža in dolžina) in (4) histologija ščitnice.

Humana usmrtitev paglavcev

43. Podvzorec paglavcev pri 62. fazi NF (5 osebkov na ponovljeni vzorec) je treba evtanazirati, tako da se za 30 minut potopijo v ustrezne količine (npr. 500 ml) raztopine za anestezijo (npr. 0,3-odstotna raztopina MS-222, trikain metan sulfonat, št. CAS 886-86-2). Raztopino MS-222 je treba pufrati z natrijevim bikarbonatom do vrednosti pH približno 7,0, ker je nepufrana raztopina MS-222 kisla in draži kožo žab, kar povzroči slabo absorpcijo in nepotreben dodaten stres za organizme.

44. Paglavec se z majhnim sakom odstrani iz poskusne komore in prenese (vnese) v raztopino za evtanazijo. Žival je pravilno evtanazirana in pripravljena za obdukcijo, ko se ne odziva na zunanje dražljaje, kot je ščipanje v zadnji krak s kleščami.

Morfometrija (teža in dolžina)

45. Mokro težo (na mg natančno) in dolžino od ust do zadnjične odprtine (SVL) (na 0,1 mm natančno) vsakega paglavca je treba izmeriti takoj, ko z anestezijo postane neodziven (slika 2a). Za meritev SVL s fotografije se lahko uporabi programska oprema za analizo slike. Paglavce je treba pred tehtanjem osušiti s pivnikom, da se odstrani odvečna adherentna voda. Po

▼M8

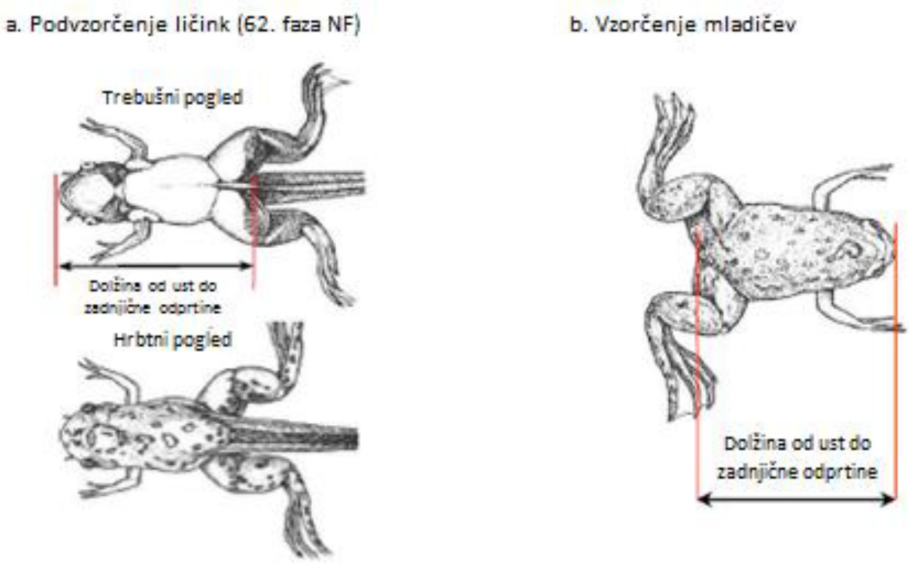
meritvah velikosti (teža in SVL) je treba evidentirati ali zapisati vse velike morfološke nenormalnosti in/ali klinične znake toksičnosti, kot so skolioza (glej Dodatek 8), petehije ali hemoragija, priporoča pa se tudi digitalna dokumentacija. Petehije so majhne rdeče ali vijolične krvavitve v kožnih kapilarah.

Odvzem in fiksacija tkiva

46. Pri podvzorcu ličink se opravi histološka analiza ščitnične žleze. Spodnji del trupa za sprednjimi kraki se odstrani in zavrže. Obrezani trup se fiksira v Davidsonovem fiksativu. Fiksativa mora biti v posodi vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Za ustrezno fiksiranje zadevnih tkiv je treba doseči ustrezno mešanje ali kroženje fiksativa. Vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu najmanj 48 ur, vendar ne več kot 96 ur, nakar se sperejo v deionizirani vodi in shranijo v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu (1) (29).

Histologija ščitnice

47. Pri vsakem podvzorcu ličink (fiksirana tkiva) se opravi histološka preiskava ščitnične žleze, tj. diagnoza in ocena resnosti (29) (30).



Slika 2: Orientacijske točke za merjenje dolžine od ust do zadnjične odprtine pri preskusu LAGDA pri 62. fazi NF (a) in mladih žabah (b). Odločilne značilnosti pri 62. fazi NF (a): glava je enako široka kot trup, vohalni živec je krajši od premera vohalnega bulbusa (hrbtni pogled), sprednja kraka pa sta v višini srca (trebušni pogled). Slike povzete po Nieuwkoopu in Faberju (1994).

Konec izpostavljenosti ličink

48. Glede na začetno število paglavcev se pričakuje, da bo verjetno majhen delež osebkov, ki se ne bodo razvili normalno in dokončali preobrazbe (66. faza NF) v razumnem času. Izpostavljenost ličink ne sme trajati več kot 70 dni.

▼M8

Vse preostale paglavce ob koncu tega obdobja je treba evtanazirati (glej odstavek 43), izmeriti njihovo mokro težo in SVL, določiti fazo po Nieuwkoopu in Faberju, 1994, ter zabeležiti vse razvojne nenormalnosti.

Izločitev po 66. fazi NF

49. Od 66. faze NF (popolna resorpcija repa) mora do konca izpostavljenosti ostati deset osebkov na akvarij. Ko vse živali dosežejo 66. fazo NF ali po 70 dneh (odvisno od tega, kaj je prej), je zato potrebna izločitev. Živali po 66. fazi NF, ki ne bodo ostale izpostavljene, je treba izbrati naključno.

50. Živali, ki niso izbrane za nadaljnjo izpostavljenost, se evtanazirajo (glej odstavek 43). Pri vsaki živali se izmerijo razvojna faza, mokra teža in SLV (slika 2b) ter opravi makroskopska obdukcija. Fenotipski spol (na podlagi morfologije spolnih žlez) se zabeleži kot samica, samec ali nedoločen.

Vzorčenje mladih osebkov

Pregled vzorčenja mladih osebkov

51. Preostale živali ostanejo izpostavljene do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli z vodo za redčenje (in/ali kontroli s topilom, če je ustrezno). Po koncu obdobja izpostavljenosti se preostale živali evtanazirajo (največ 10 žab na ponovljeni vzorec), pri čemer se izmerijo ali ocenijo in evidentirajo različne končne točke: (1) morfometrija (teža in dolžina), (2) razmerja med fenotipskim/genotipskim spolom, (3) teža jeter (jetrno-somatski indeks), (4) histopatologija (spolne žleze, spolni vodi, jetra in ledvice) in neobvezno (5) VTG v plazmi.

Humana usmrtitev žab

52. Vzorci mladih osebkov, tj. žab po preobrazbi, se evtanazirajo z intraperitonealnim injiciranjem anestetika, npr. 10-odstotnega MS-222 v ustrezni raztopini fosfatnega pufra. Žabe se lahko vzorčijo, ko postanejo neodzivne (približno dve minuti po injiciranju, če se uporabi 10-odstotni MS-222 v odmerku 0,01 ml na g žabe). Čeprav bi se lahko mlade žabe potopile v višjo koncentracijo anestetika (MS-222), so izkušnje pokazale, da anesteziranje po tej metodi traja dlje in da zaradi tega vzorčenje morda ne bo mogoče. Z injiciranjem se zagotovi učinkovita in hitra evtanazija pred vzorčenjem. Vzorčenje se lahko začne šele, ko je potrjena neodzivnost žab, da se zagotovi, da so živali mrtve. Če so pri žabah vidni znaki precejšnjega trpljenja (zelo hudo trpljenje, pogin je mogoče zanesljivo napovedati) in se obravnavajo kot umirajoče, je treba živali anestezirati in evtanazirati ter jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtne primere. Kadar se žaba evtanazira zaradi obolevnosti, je to treba zabeležiti in sporočiti. Odvisno od tega, kdaj med študijo je žaba evtanazirana, se lahko žaba zadrži za histopatološko analizo (fiksiranje žabe za morebitno histopatologijo).

Morfometrija (teža in dolžina)

53. Meritve mokre teže in SLV (slika 2b) so enake meritvam, predstavljenim pri podvzorčenju ličink.

▼M8

VTG v plazmi (neobvezno)

54. VTG je splošno sprejet biooznačevalec, ki izhaja iz izpostavljenosti estrogenim kemikalijam. Za preskus LAGDA se lahko pri vzorcih mladih osebkov neobvezno izmeri VTG v plazmi (to je lahko še posebej ustrezno, kadar se zdi, da je preskusna kemikalija estrogen).

55. Pri evtanaziranem mladem osebku se odrežeta zadnja kraka in odvzame kri s heparinizirano kapilaro (čeprav so lahko primerne druge metode odvzema krvi, na primer punkcija srca). Kri se iztisne v mikrocentrifugirko (npr. s prostornino 1,5 ml), in ta se centrifugira za pridobitev plazme. Vzorce plazme je treba do določitve VTG hraniti pri –70 °C ali nižji temperaturi. Koncentracija VTG v plazmi se lahko izmeri z metodo encimskega imunskega testa (ELISA) (Dodatek 6) ali drugo metodo, kot je masna spektrometrija (31). Zaradi večje občutljivosti so zaželena protitelesa, specifična za vrsto.

Določitev genetskega spola

56. Genetski spol vsake mlade žabe se oceni na podlagi označevalcev, ki so jih razvili Yoshimoto *et al.* (11). Za določitev genetskega spola se med seciranjem odvzame del zadnjega kraka (ali cel krak) (ali katerega koli drugega tkiva) in shrani v mikrocentrifugirki (vzorci tkiva žab se lahko vzamejo iz katerega koli tkiva). Do izolacije deoksiribonukleinske kisline (DNK) se lahko tkivo shrani pri –20 °C ali nižji temperaturi. Izolacija DNK iz tkiv se lahko opravi s pripomočki, ki so na voljo na trgu, prisotnost ali odsotnost označevalca pa se analizira z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Dodatek 5). Na splošno je ujemanje med histološkim spolom in genotipom pri kontrolnih živalih ob vzorčenju mladih osebkov v kontrolnih skupinah več kot 95-odstotno.

Odvzem in fiksacija tkiva za histopatologijo

57. Pri končnem vzorčenju se za histološko analizo odvzamejo spolne žleze, spolni vodi, ledvice in jetra. Trebušna votlina se odpre, jetra se izrežejo in stehtajo. Nato se iz spodnjega dela trebušne votline previdno odstranijo prebavni organi (npr. želodec, čreva), da se razkrijejo spolne žleze, ledvice in spolni vodi. Zabeležiti je treba vse velike morfološke nenormalnosti v spolnih žlezah. Nazadnje je treba odstraniti zadnja kraka, če nista bila predhodno odstranjena že za odvzem krvi. Odvzeta jetra in trup s spolnimi žlezami *in situ* je treba nemudoma vnesti v Davidsonov fiksativ. Fiksativa mora biti v posodi vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu najmanj 48 ur, vendar ne več kot 96 ur, nakar se sperejo v deionizirani vodi in shranijo v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu (1) (29).

Histopatologija

58. Pri vsakem vzorcu mladega osebka se opravi histološka ocena patoloških sprememb v tkivu spolnih žlez, spolnih vodov, jeter in ledvic, tj. diagnoza in ocena resnosti (32). Iz te ocene se izpelje tudi fenotip spolnih žlez (npr. jajčnik, testis, dvospolna), pri čemer se lahko te ugotovitve skupaj z meritvami posameznega genetskega spola uporabijo za izračun razmerij med fenotipskim/genotipskim spolom.

▼M8

PODATKI IN POROČANJE

Statistična analiza

59. S preskusom LAGDA se pridobijo tri oblike podatkov, ki jih je treba statistično analizirati: (1) kvantitativni kontinuirani podatki (teža, SVL, LSI, VTG), (2) podatki o času do dogodka za razvojne stopnje (tj. dnevih do 62. faze NF od začetka preskusa) in (3) ordinalni podatki v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz iz histopatoloških ocen.

60. Priporočljivo je, da načrt preskusa in izbira statističnega testa zagotavljata ustrezno moč opažanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC ali ECx. Priporočljivo je, da se pri statističnih analizah podatkov (na splošno na podlagi srednje vrednosti pri ponovljenem vzorcu) upoštevajo postopki, opisani v dokumentu Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (33). Dodatek 7 te preskusne metode vsebuje priporočeno drevo odločanja za statistično analizo ter smernice za obdelavo podatkov in izbiro najustreznejšega statističnega testa ali modela za uporabo pri preskusu LAGDA.

61. Ker je genotipski spol določen za vse žabe, je treba podatke iz vzorčenja mladih osebkov (npr. rast, LSI) analizirati ločeno za vsak genotipski spol.

Pomisleki o analizi podatkov

Uporaba ogroženih ponovljenih vzorcev in tretiranj

62. Ponovljeni vzorci in tretiranja lahko postanejo ogroženi zaradi čezmerne smrtnosti zaradi očitne toksičnosti, bolezni ali tehnične napake. Če je tretiranje ogroženo zaradi bolezni ali tehnične napake, morajo biti za analizo na voljo tri neogrožena tretiranja s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci. Če se očitna toksičnost pojavi v zelo obremenjenih tretiranjih, je zaželeno, da so za analizo na voljo vsaj tri ravni tretiranj s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci (v skladu s pristopom najvišje tolerančne koncentracije za smernice OECD za preskušanje (34)). Znaki očitne toksičnosti lahko poleg smrtnosti vključujejo učinke na obnašanje (npr. lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti), morfološke lezije (npr. hemoragične lezije, edeme v trebušni votlini) ali inhibicijo normalnih odzivov na hranjenje pri kvalitativni primerjavi s kontrolnimi živalmi.

Kontrola s topilom

63. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih učinkov topila (če se uporabi). Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine z vodo za redčenje. Najpomembnejši končni točki, ki ju je treba obravnavati v tej analizi, sta dejavnika rasti (teža in dolžina), saj lahko nanju vplivajo splošne toksičnosti. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino z vodo za redčenje in kontrolno skupino s topilom, je treba za ugotovitev, ali je veljavnost preskusa ogrožena, uporabiti najboljšo strokovno presojo. Če se dve kontrolni skupini razlikujeta, je treba tretirane skupine, izpostavljene kemikaliji, primerjati s kontrolo s topilom, razen če je znano, da je zaželena primerjava s kontrolo z vodo za redčenje. Če med dvema kontrolnima skupinama ni statistično značilne razlike, je priporočljivo, da se tretirane skupine, izpostavljene preskusni kemikaliji, primerjajo z združenima kontrolnima skupinama (kontrolna skupina s topilom in kontrolna skupina z vodo za redčenje), razen če je znano, da je zaželena primerjava le s kontrolno skupino z vodo za redčenje ali kontrolno skupino s topilom.

▼M8

Poročilo o preskusu

64. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

— fizikalne lastnosti in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;

— snov iz ene sestavine:

fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno);

— snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusna vrsta:

— znanstveno ime, sev, če je na voljo, vir in metoda zbiranja oplojenih jajčec ter nadaljnje ravnanje;

— pojavnost skolioze v preteklih kontrolah za uporabljeno založno kulturo.

Preskusni pogoji:

— obdobje osvetljenosti;

— načrt preskusa (npr. velikost, material in vodna prostornina komor, število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število preskusnih organizmov na ponovljeni vzorec);

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je uporabljeno);

— metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);

— analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;

— značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni jodid, skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;

— nominalne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni;

— kakovost vode v preskusnih posodah: pH, temperatura (dnevna) in koncentracija raztopljenega kisika;

▼**M8**

— podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

Rezultati:

— dokazi, da so kontrole izpolnjevale merila za veljavnost;

— podatki za kontrolne skupine (in kontrolo s topilom, kadar se uporabi) in tretirane skupine: opaženi smrtnost in nenormalnost, čas do 62. faze NF, histološka ocena ščitnice (samo pri vzorcu ličink), rast (teža in dolžina), LSI (samo pri vzorcu mladih osebkov), razmerje med genetskim/fenotipskim spolom (samo pri vzorcu mladih osebkov), rezultati histopatološke ocene za spolne žleze, spolne vode, ledvice in jetra (samo pri vzorcu mladih osebkov) in VTG v plazmi (samo pri vzorcu mladih osebkov, če se opravi);

— pristop k statistični analizi in obdelava podatkov (uporabljeni statistični test ali model);

— koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za vsak ocenjeni odziv;

— najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC)) za vsak ocenjeni odziv ($\alpha = 0,05$). EC_x za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake;

— vsako odstopanje od preskusne metode in odkloni od meril za sprejemljivost ter razmisleki o morebitnih posledicah za rezultat preskusa.

65. Za rezultate meritev končnih točk je treba predstaviti srednje vrednosti in njihove standardne odklone (na podlagi ponovljenih vzorcev in koncentracij, če je mogoče).

66. Izračunati je treba srednji čas do 62. faze NF v kontrolah in ga predstaviti kot srednjo vrednost median ponovljenih vzorcev in njihovega standardnega odklona. Prav tako je treba za tretiranja izračunati mediano tretiranja in jo predstaviti kot srednjo vrednost median ponovljenih vzorcev in njihovega standardnega odklona.

VIRI

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(3) Nieuwkoop, P. D., in Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, ZDA.

(4) Kloas, W., in Lutz, I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16–27.

▼M8

(5) Chang, C., Witschi, E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.

(6) Gallien, L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando, I., in Merchant-Larios, H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281–285.

(8) Miyata, S., Koike, S., in Kubo, T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.

(9) Mikamo, K., in Witschi, E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead, A. W., Kosian, P. A., Korte, J. J., Holcombe, G. W., Woodis, K., in Degitz, S. J. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.

(11) Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., in Ito, M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

(12) Olmstead, A. W., Korte, J. J., Woodis, K. K., Bennett, B. A., Ostazeski, S., in Degitz, S. J. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

(13) Tobias, M. L., Tomasson, J., in Kelley, D. B. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441–448.

(14) Qin, Z. F., Qin, X. F., Yang, L., Li, H. T., Zhao, X. R., in Xu, X. B. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321–327.

(15) Porter, K. L., Olmstead, A. W., Kumsher, D. M., Dennis, W. E., Sprando, R. L., Holcombe, G. W., Korte, J. J., Lindberg-Livingston, A., in Degitz, S. J. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Filadelfija, Pensilvanija, ZDA.

(17) Poglavje C.4 te priloge: Določanje „dobre“ biorazgradljivosti.

(18) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biorazgradljivost – CO2 v zaprtih posodah (preskus nadprostora).

(19) Kahl, M. D., Russom, C. L., DeFoe, D. L., in Hammermeister, D. E. (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., in McLachlan, M. S. (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (št. 23), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(22) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., in Pickford, D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Filadelfija, Pensilvanija, ZDA.

(24) Read, B. T. (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Združeno kraljestvo, 84 str.

(25) Poglavje C.38 te priloge: Preskus preobrazbe dvoživk.

(26) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.

(27) Poglavje C.41 te priloge: Preskus spolnega razvoja rib.

(28) Poglavje C.49 te priloge: Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka.

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 82), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(30) Grim, K. C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Wolf, D. C., in Tietge, J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.

(31) Luna, L. G., in Coady, K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 228), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (št. 54), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

(34) Hutchinson, T. H., Bögi, C., Winter, M. J., Owens, J. W., 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197–202.

▼M8

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije: povzroča učinke na ravni populacije.

Kemikalija: snov ali zmes.

ELISA: encimski imunski test.

ECx: (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti.EC50 je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

dpo: dnevi po oploditvi.

Pretočni preskus: preskus, pri katerem se preskusne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

Os HPG: os hipotalamus–hipofiza–spolne žleze.

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC): je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC). Smernice so zajete v Dodatku 7.

Srednja smrtna koncentracija (LC50): je koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC): je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$) v danem obdobju izpostavljenosti.

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoprotein in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

▼**M8**

Dodatek 2

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Snov	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amoniak	1 µg/l
preostali klor	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

▼**M8**

Dodatek 3

PRESKUSNI POGOJI ZA PRESKUS LAGDA

1. Preskusna vrsta	*Xenopus laevis.*
2. Vrsta preskusa	Kontinuirani pretočni sistem.
3. Temperatura vode	Nominalna temperatura je 21 °C. Srednja temperatura med trajanjem preskusa je 21 ± 1 °C (razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji ne smejo presegati 1,0 °C).
4. Kakovost osvetlitve	Fluorescenčne sijalke (široki spekter), 600–2 000 luksov (lumnov/m^2) na površini vode.
5. Obdobje osvetljenosti	12 ur svetlobe, 12 ur teme.
6. Količina preskusne raztopine in preskusna posoda (akvarij)	4–10 l (najmanjša globina vode 10–15 cm). Akvarij iz stekla ali nerjavnega jekla.
7. Izmenjave količine preskusnih raztopin	Konstantne zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji (npr. 5 izmenjav količine na akvarij na dan).
8. Starost preskusnih organizmov na začetku	8.–10. faza po Nieuwkoopu in Faberju (NF).
9. Število organizmov na ponovljeni vzorec	20 živali (zarodkov)/akvarij (ponovljeni vzorec) ob začetku izpostavljenosti in 10 živali (mladih osebkov)/akvarij (ponovljeni vzorec) po 66. fazi NF do konca izpostavljenosti.
10. Število tretiranj	Najmanj 4 tretiranja s preskusno kemikalijo in ustrezne kontrole.
11. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje	4 ponovljeni vzorci na tretiranje za preskusno kemikalijo in 8 ponovljenih vzorcev za kontrole.
12. Število organizmov na preskusno koncentracijo	Najmanj 80 živali na tretiranje za preskusno kemikalijo in najmanj 160 živali za kontrole.
13. Voda za redčenje	Vsaka voda, ki omogoča normalno rast in razvoj *X. laevis* (npr. izvirska voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem).
14. Prezračevanje	Se ne zahteva, vendar bo prezračevanje akvarijev morda potrebno, če ravni raztopljenega kisika padejo pod priporočene meje in če povečanje pretoka preskusne raztopine doseže zgornjo mejo.
15. Raztopljeni kisik preskusne raztopine	Raztopljeni kisik: ≥ 40 % vrednosti nasičenosti z zrakom ali ≥ 3,5 mg/l.

▼**M8**

16.	pH preskusne raztopine	6,5–8,5 (razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji ne smejo presegati 0,5).
17.	Trdota in alkalnost preskusne raztopine	10–250 mg $CaCO_3$/l.
18.	Način hranjenja	(Glej Dodatek 4.)
19.	Obdobje izpostavljenosti	Od 8.–10. faze NF do desetih tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontrolni skupini z vodo in/ali topilom (največ 17 tednov).
20.	Biološke končne točke	Smrtnost (in nenormalen videz), čas do 62. faze NF (pri vzorcu ličink), histološka ocena ščitnice (pri vzorcu ličink), rast (teža in dolžina), jetrno-somatski indeks (pri vzorcu mladih osebkov), razmerje med genetskim/fenotipskim spolom (pri vzorcu mladih osebkov), rezultati histopatološke ocene za spolne žleze, spolne vode, ledvice in jetra (pri vzorcu mladih osebkov) ter VTG v plazmi (pri vzorcu mladih osebkov, neobvezno).
21.	Merila za veljavnost preskusa	Raztopljeni kisik ≥ 40 % vrednosti nasičenosti z zrakom; srednja temperatura vode mora biti 21 ± 1 °C, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji pa morajo biti < 1,0 °C; pH preskusne raztopine mora biti med 6,5 in 8,5; smrtnost v kontroli mora biti ≤ 20 % pri vsakem ponovljenem vzorcu, srednji čas do 62. faze NF v kontroli mora biti ≤ 45 dni; srednja teža preskusnih organizmov pri 62. fazi NF in ob koncu preskusa v kontrolah in kontrolah s topilom (če se uporabijo) mora biti 1,0 ± 0,2 oziroma 11,5 ± 3 g; na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti.

▼M8

Dodatek 4

NAČIN HRANJENJA

Opozoriti je treba, da so kljub temu priporočenemu načinu hranjenja dovoljene druge možnosti, če preskusni organizmi ustrezno hitro rastejo in se razvijajo.

Hranjenje ličink

Pripravek za prehrano ličink

A. 1:1 (v/v) začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)

1. Začetna hrana za postrvi: pri visoki hitrosti mešalnika 20 sekund mešajte 50 g začetne hrane za postrvi (drobna zrnca ali prah) in 300 ml primerne filtrirane vode.

2. Mešanica alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana): pri visoki hitrosti mešalnika 40 sekund mešajte 12 g ploščic alg spirulina in 500 ml filtrirane vode, zmešajte 12 g hrane Tetrafin® (ali enakovredne hrane) s 500 ml filtrirane vode in nato obe mešanici združite, da dobite 1 l z 12 g/l alg spirulina in 12 g/l hraneTetrafin® (ali enakovredne hrane).

3. Zmešajte enake količine zmešane začetne hrane za postrvi in mešanice alge/TetraFin® (ali enakovredne hrane).

B. Solinski rakci:

15 ml jajčec solinskih rakcev se vali v 1 l slane vode (pripravljene tako, da se v 1 l deionizirane vode doda 20 ml NaCl). Po 24-urnem prezračevanju pri sobni temperaturi in konstantni svetlobi se solinski rakci zberejo. Na kratko se pusti, da se solinski rakci usedejo, tako da se za 30 minut ustavi prezračevanje. Ciste, ki splavajo na vrh posode, se odlijejo in zavržejo, rakci pa se pretočijo skozi ustrezne filtre in razredčijo do 30 ml s filtrirano vodo.

Protokol hranjenja

V preglednici 1 sta navedeni vrsta in količina hrane, uporabljeni med izpostavljenostjo ličink. Živali je treba od ponedeljka do petka hraniti trikrat dnevno, ob koncih tedna pa enkrat dnevno.

Preglednica 1

Način hranjenja ličink *X. laevis* v pretočnih razmerah

Čas (*) (po oploditvi)	Začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)		Solinski rakci	
	delavnik (trikrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)	delavnik (dvakrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)
4.–14. dan (v tednih 0 in 1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dneva) 1 ml (od 16. dneva)	0,5 ml (od 8. do 15. dneva) 1 ml (od 16. dneva)
2. teden	0,67 ml	2,4 ml		
3. teden	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. teden	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. teden	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Čas (*) (po oploditvi)	Začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)		Solinski rakci	
	delavnik (trikrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)	delavnik (dvakrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)
6. teden	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. teden	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8.–10. teden	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Dan 0 je opredeljen kot dan, ko se injicira hCG.

Prehod s prehrane za ličinke na prehrano za mlade osebke

Ko ličinke končajo preobrazbo, preidejo na prehransko formulo za mlade osebke, kot je pojasnjena spodaj. Pri tem prehodu je treba ob povečanju količine prehrane za mlade osebke količino prehrane za ličinke zmanjšati. To je mogoče doseči s sorazmernim zmanjševanjem hrane za ličinke ob sorazmernem povečevanju hrane za mlade osebke, ko vsaka skupina petih paglavcev preseže 62. fazo NF in se približa dokončanju preobrazbe v 66. fazi NF.

Hranjenje mladih osebkov

Prehrana mladih osebkov

Ko je preobrazba končana (66. faza), se način hranjenja spremeni v samo visokokakovostno tonečo hrano za žabe v velikosti 3/32 palcev (Xenopus Express™, Florida, ZDA) ali enakovredno hrano.

Pripravek iz zdrobljenih pelet za prehod s prehrane za ličinke na prehrano za mlade osebke

Peleti toneče hrane za žabe se na hitro zmeljejo v kavnem mlinčku ali mešalniku ali zdrobijo v možnarju, da se njihova velikost zmanjša za približno tretjino. Ob predolgi obdelavi nastane prah, ki pa se odsvetuje.

Protokol hranjenja

V **preglednici 2** sta navedeni vrsta in količina hrane, uporabljeni v življenjskih fazah mladih osebkov in odraslih živali. Živali je treba hraniti enkrat dnevno. Opozoriti je treba, da živali med postopkom preobrazbe še naprej prejemajo delež solinskih rakcev, dokler ni preobrazba končana pri > 95 % živali.

Na dan konca preskusa se živali ne smejo hraniti, tako da hrana ne vpliva na meritve teže.

Preglednica 2

Način hranjenja mladih osebkov *X. laevis* v pretočnih razmerah. Opozoriti je treba, da živali, ki se niso preobrazile, vključno s tistimi, pri katerih je preobrazba zakasnila zaradi tretiranja s kemikalijo, ne morejo jesti nezdrobljenih peletov

Čas (*) (tedni po srednjem datumu preobrazbe)	Zdrobljeni peleti (v mg na žabico)	Celi peleti (v mg na žabico)
Ko živali končajo preobrazbo	25	0
0.–1. teden	25	28

▼**M8**

Čas (*) (tedni po srednjem datumu preobrazbe)	Zdrobljeni peleti (v mg na žabico)	Celi peleti (v mg na žabico)
2.–3. teden	0	110
4.–5. teden	0	165
6.–9. teden	0	220

(*) Prvi dan tedna 0 je srednji datum preobrazbe pri kontrolnih živalih.

▼M8

Dodatek 5

DOLOČITEV GENETSKEGA SPOLA

Metoda določitve genetskega spola za *Xenopus laevis* temelji na Yoshimoto *et al.*, 2008. Podrobne postopke za genotipizacijo je po potrebi mogoče najti v tej publikaciji. Uporabijo se lahko tudi druge metode (npr. visokozmogljivostna qPCR), če se štejejo za primerne.

Začetna oligonukleotida *X. laevis*

Označevalec DM-W

Smerni začetni oligonukleotid: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Protismerni začetni oligonukleotid: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivna kontrola

Smerni začetni oligonukleotid: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Protismerni začetni oligonukleotid: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Prečiščevanje DNK

DNK izolirajte iz mišičnega ali kožnega tkiva, npr. s kompletom Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506) ali podobnim proizvodom v skladu z navodili iz kompleta. DNK se lahko spere iz centrifugiranih kolon z manj pufra, da se dobijo bolj koncentrirani vzorci, če se štejejo za potrebne za PCR. Upoštevajte, da je DNK precej stabilna, zato se je treba izogibati navzkrižni kontaminaciji, zaradi katere bi bili lahko samci napačno opredeljeni kot samice ali obratno.

PCR

V **preglednici 1** je predstavljen protokol za vzorec z uporabo JumpStart™ *Taq* iz Sigme.

Preglednica 1

Protokol za vzorec z uporabo JumpStart™ *Taq* iz Sigme

Osnovna zmes (Master Mix)	1 x (µl)	[Končna]
NFW (*)	11	–
10 x pufer	2,0	–
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM vsak)	0,4	200 µM
Označevalec za začetni oligonukleotid (8 µM)	0,8	0,3 µM
Označevalec za protismerni začetni oligonukleotid (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola za začetni oligonukleotid (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrola za protismerni začetni oligonukleotid (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 enot/µl
Matrična DNK	1,0	~ 200 pg/µl

(*) Voda brez nukleaze.
Opomba: Ko pripravljate osnovno zmes, pripravite dodatno količino, da upoštevate morebitne izgube, do katerih lahko pride pri pipetiranju (primer: 25 x je treba uporabiti za samo 24 reakcij).

▼**M8**

Reakcija:

Osnovna zmes	19,0 µl
Matrica	1,0 µl
Skupaj	20,0 µl

Profil termopomnoževalnika:

1. korak	94 °C	1 min
2. korak	94 °C	30 sek
3. korak	60 °C	30 sek
4. korak	72 °C	1 min
5. korak	Pojdite na 2. korak.	35 ciklov
6. korak	72 °C	1 min
7. korak	4 °C	zadrževanje

Produkti PCR se lahko nemudoma nanesejo na gel ali pa shranijo pri 4 °C.

Agarozna gelska elektroforeza (3 %) (protokol za vzorec)

50 X TAE

Tris	24,2 g
Ledocetna kislina	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Dodajte vodo do 100 ml.

1 X TAE

H_2O	392 ml
50 X TAE	8 ml

3: 1 agaroza

3 deli agaroze NuSieve™ GTG™

1 del agaroze Fisher z nizko elektroendoosmozo (EEO)

Metoda

1. Pripravite 3-odstotni gel, tako da v 43 ml 1 X TAE dodate 1,2 g agarozne mešanice. Premešajte, da se velike grude razpustijo.

2. Agarozno mešanico prevrite v mikrovalovni pečici, dokler se popolnoma ne razpusti (pazite, da ne bo skipela). Pustite, da se malo ohladi.

3. Dodajte 1,0 µL etidijevega bromida (10 mg/ml). Pretresite stekleničko. Upoštevajte, da je etidijev bromid mutagen, tako da je treba za ta korak, kolikor je tehnično mogoče, uporabiti druge kemikalije, da se zmanjša tveganje za zdravje delavcev ([1]).

4. Gel vlijte v kalup z glavničkom. Pustite, da se popolnoma ohladi.

([1]) V skladu s členom 4(1) Direktive 2004/37/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o varovanju delavcev pred nevarnostmi zaradi izpostavljenosti rakotvornim ali mutagenim snovem pri delu (šesta posebna direktiva v skladu s členom 16(1) Direktive Sveta 89/391/EGS) (UL L 158, 30.4.2004, str. 50).

▼**M8**

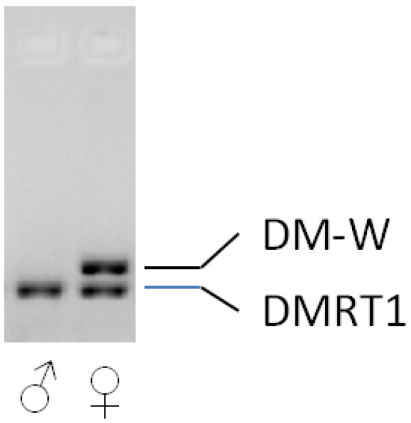
5. Gel dodajte v napravo. Prekrijte ga z 1 X TAE.

6. Vsakim 10 µl produkta PCR dodajte 1 µl nanašalnega barvila (6x loading dye).

7. Vzorce s pipeto prenesite v jamice.

8. Elektroforeza ~ 20 minut poteka pri konstantni napetosti 160 voltov.

   Slika agaroznega gela, na kateri so vidni vzorci prog, značilni za moški in ženski osebek, je prikazana na **sliki 1**.



Slika 1: Slika agaroznega gela, na kateri je viden vzorec proge, značilen za moški (♂) osebek (ena proga ~ 203 bp: DMRT1) in ženski (♀) osebek (dve progi pri ~ 259 bp:DM-W in 203 bp:DMRT1).

VIRI

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., in Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469–2 474.

▼M8

Dodatek 6

MERJENJE VITELOGENINA

Vitelogenin (VTG) se meri z metodo encimskega imunskega testa (ELISA), ki je bila prvotno razvita za VTG pri črnoglavem pisancu (Parks *et al.*, 1999). Protitelesa za *X. laevis* trenutno niso komercialno dostopna. Vendar je glede na obilico informacij za ta protein in razpoložljivost stroškovno učinkovitih komercialnih storitev za izdelavo protiteles razumno, da lahko laboratoriji zlahka razvijejo ELISA za to merjenje (Olmstead *et al.*, 2009). Tudi Olmstead *et al.* (2009) zagotavljajo opis testa, kot je prilagojen za VTG pri *X. tropicalis*, kot je prikazano v nadaljevanju. Pri metodi se uporablja protitelo, izdelano za VTG *X. tropicalis*, vendar je znano, da deluje tudi pri VTG *X. laevis*. Opozoriti je treba, da je mogoče uporabiti tudi nekonkurenčne teste ELISA in da imajo lahko ti nižje meje zaznavnosti kot spodaj opisana metoda.

Pribor in reagenti

— Serum predabsorbiranega 1. protitelesa

— En del seruma 1. protitelesa proti VTG *X. tropicalis* zmešajte z dvema deloma plazme kontrolnih samcev in pustite pri sobni temperaturi ~ 75 minut, dajte na led za 30 minut, centrifugirajte > 20 K x G 1 uro pri 4 °C, odstranite supernatant, alikvot, shranite pri –20 °C.

— 2. protitelo

— HRP konjugat kozjih protikunčjih protiteles IgG (npr. Bio-Rad 172-1019)

— Standard VTG

— prečiščeni VTG *X. laevis* pri 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidin) (npr. KPL 50-76-00; ali Sigma T0440)

— Normalni kozji serum (NGS)(npr. Chemicon® S26–100 ml)

— Polistirenske 96-jamične mikrotitrne plošče za encimskim imunski test (npr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— Hibridizacijska pečica pri 37 °C (ali inkubator s hitrim uravnavanjem pogojev) za plošče, vodna kopel za epruvete

— Druga običajna laboratorijska oprema, kemikalije in pribor

Recepti

Premazni pufer (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
voda	428 ml

10x PBS (0,1 M fosfata, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

▼M8

Pufer za spiranje (PBST):

10x PBS	100 ml
voda	900 ml

Vrednost pH prilagodite na 7,3 z 1 M HCl, nato dodajte 0,5 ml Tween-20.

Analizni pufer:

normalni kozji serum (NGS)	3,75 ml
pufer za spiranje	146,25 ml

Odvzem vzorcev

Kri se odvzame s heparinizirano mikrohematokritsko cevko in postavi na led. Po triminutnem centrifugiranju se cevka zareže in prelomi, plazma pa se iztisne v 0,6-mililitrske mikrocentrifugirke, ki vsebujejo 0,13 enote liofiliziranega aprotinina. (Te mikrocentrifugirke se pripravijo vnaprej, tako da se doda ustrezna količina aprotinina, nato se zamrznejo in liofilizirajo v vakuumskem koncentratorju pri nizki temperaturi, dokler niso suhe.) Plazmo do analize hranite pri –80 °C.

Postopek za eno ploščo

Prekrivanje plošče

Zmešajte 20 µl prečiščenega VTG z 22 ml karbonatnega pufra (končni 3 µg/ml). V vsako jamico na 96-jamični plošči dodajte 200 µl. Ploščo prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in pustite dve uri inkubirati pri 37 °C (ali čez noč pri 4 °C).

Blokiranje plošče

Blokirna raztopina se pripravi tako, da se 2 ml normalnega kozjega seruma (NGS) doda v 38 ml karbonatnega pufra. Odstranite prekrivno raztopino in osušite. V vsako jamico dodajte 350 µl blokirne raztopine. Prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in dve uri inkubirajte pri 37 °C (ali čez noč pri 4 °C).

Priprava standardov

5,8 µl standarda prečiščenega VTG se zmeša z 1,5 ml analiznega pufra v 12 x 75-milimetrski epruveti iz borosilikatnega stekla za enkratno uporabo. S tem se pridobi 12 760 ng/ml. Nato se opravi zaporedno redčenje, tako da se doda 750 µl predhodne razredčine v 750 µl analiznega pufra, da se dobijo končne koncentracije 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 in 50 ng/ml.

Priprava vzorcev

Začnite z razredčino 1: 300 (npr. zmešajte 1 µl plazme z 299 µl analiznega pufra) ali 1: 30 plazme v analiznem pufru. Če se pričakuje velika količina VTG, bodo morda potrebne dodatne ali večje razredčine. B/B_o poskušajte ohraniti v območju standardov. Za vzorce brez znatnega VTG, npr. kontrolne samce in samice (ki so vsi nezreli), uporabite razredčino 1: 30. Manj razredčeni vzorci lahko pokažejo neželene učinke matrice.

Poleg tega je priporočljivo, da se na vsaki plošči izvede pozitivna kontrola. Vzorec za kontrolo je pridobljen iz plazme, ki vsebuje visoke ravni VTG. Plazma se najprej razredči v NGS, razdeli v alikvote in shrani pri –80 °C. Za vsako ploščo se alikvot odtaja, nadalje razredči v analiznem pufru in uporabi podobno kot preskusni vzorec.

▼**M8**

Inkubacija s 1. protitelesom

Prvo protitelo se pripravi tako, da se serum predabsorbiranega 1. protitelesa razredči v razmerju 1: 2000 v analiznem pufru (npr. 8 µl v 16 ml analiznega pufra). V stekleni epruveti zmešajte 300 µl raztopine 1. protitelesa s 300 µl vzorca/standarda. Epruveta B_o se pripravi podobno s 300 µl analiznega pufra in 300 µl protitelesa. Pripraviti je treba tudi epruveto NSB samo z uporabo 600 µl analiznega pufra, tj. brez protiteles. Epruvete prekrijte s parafilmom in nežno obračajte, da se premešajo. Eno uro inkubirajte v vodni kopeli pri 37 °C.

Spiranje plošče

Tik pred končano inkubacijo 1. protitelesa ploščo sperite. To se stori tako, da se vsebina strese iz plošče, plošča pa osuši z vpojnim papirjem. Jamice najprej napolnite s 350 µl raztopine za spiranje, nato pa to izlijte in jamice osušite. Pri tem je koristna večkanalna pipeta ali spiralnik za plošče. Ta korak spiranja se ponovi še dvakrat za skupaj tri spiranja.

Nanos na ploščo

Ko je plošča sprana, vzemite epruvete iz vodne kopeli in jih nežno zavrtite. V dvojne jamice na plošči dodajte 200 µl iz vsake epruvete z vzorcem, standardom, B_o in NSB. Ploščo prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in pustite eno uro inkubirati pri 37 °C.

Inkubacija z 2. protitelesom

Po koncu inkubacije iz prejšnjega koraka je treba ploščo znova trikrat sprati, kot je navedeno zgoraj. Razredčina 2. protitelesa se pripravi tako, da se 2,5 µl 2. protitelesa zmeša s 50 ml analiznega pufra. V vsako jamico dodajte 200 µl razredčine 2. protitelesa in eno uro inkubirajte pri 37 °C.

Dodajanje substrata

Ko je inkubacija z 2. protitelesom končana, ploščo trikrat sperite, kot je opisano zgoraj. Nato v vsako jamico dodajte 100 µl substrata TMB. Pustite, da reakcija poteka 10 minut, po možnosti ne na svetlobi. Ustavite reakcijo, tako da dodate 100 µl 1 M fosforjeve kisline. S tem se bo barva spremenila z modre na živo rumeno. Z uporabo čitalca plošče izmerite absorbanco pri 450 nm.

Izračun B/Bo

Odštejte povprečno vrednost NSB od vseh meritev. B/B_o za vsak vzorec in standard se izračuna z delitvijo vrednosti absorbance (B) s povprečno absorbanco vzorca B_o.

Pridobitev standardne krivulje in določitev neznanih količin

Izdelajte standardno krivuljo s pomočjo računalniške programske opreme za izdelavo grafov (npr. Slidewrite™ ali Sigma Plot®), ki bo ekstrapolirala količino iz B/B_o vzorca na podlagi B/B_o standardov. Vrednosti, izrisane na logaritemski skali, običajno oblikujejo sigmoidno krivuljo. Lahko pa se pokažejo kot linearne, če se uporabi ozko območje standardov. Popravite količine vzorcev glede na faktor redčenja in navedite kot mg VTG/ml plazme.

Določitev minimalnih meja zaznavnosti (MDL)

Pogosto, zlasti pri normalnih samcih, ne bo jasno, kako poročati o rezultatih pri nizkih vrednostih. V takih primerih je treba uporabiti 95-odstotne ‚meje zaupanja‘, da se določi, ali je treba vrednost navesti kot nič ali kot neko drugo številko. Če je rezultat vzorca v intervalu zaupanja ničelnega standarda (B_o), je treba rezultat navesti kot nič. Minimalna meja zaznavnosti bo najnižji standard,

▼M8

ki se dosledno razlikuje od ničelnega standarda; tj. intervala zaupanja se ne prekrivata. Za vsak rezultat vzorca, ki je v okviru meje zaupanja minimalne ravni zaznavnosti ali nad njo, se navede izračunana vrednost. Če vzorec spada med ničelni standard in intervale zaupanja minimalne ravni zaznavnosti, je treba za vrednost tega vzorca navesti polovico minimalne ravni zaznavnosti.

VIRI

Olmstead, A. W., Korte, J. J., Woodis, K. K., Bennett, B. A., Ostazeski, S., in Degitz, S. J. (2009). Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A., Sullivan, C. V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113–125.

▼M8

Dodatek 7

STATISTIČNA ANALIZA

S preskusom LAGDA se pridobijo tri oblike podatkov, ki jih je treba statistično analizirati: (1) kvantitativni kontinuirani podatki, (2) podatki o času do dogodka za razvojne stopnje (tj. čas do 62. faze NF) in (3) ordinalni podatki v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz iz histopatoloških ocen. Priporočeno drevo odločanja za statistično analizo za preskus LAGDA je prikazano na sliki 1. Prav tako so v nadaljevanju navedene nekatere opombe, ki bodo morda potrebne za izvedbo statistične analize meritev iz preskusa LAGDA. Pri drevesu odločanja za analizo je treba rezultate meritev za smrtnost, rast (teža in dolžina) in jetrno-somatski indeks (LSI) analizirati v skladu z vejo „Druge končne točke“.

Kontinuirani podatki

Pri podatkih za kontinuirane končne točke je treba najprej preveriti monotonost s transformacijo podatkov z rangi, prilagoditvijo modelu ANOVA ter primerjavo linearnih in kvadratnih kontrastov. Če so podatki monotoni, je treba izvesti regresijski trendni test po Jonckheere-Terpstraju na medianah ponovljenih vzorcev, pri čemer nadaljnja analiza ni potrebna. Druga možnost za podatke, ki so normalno porazdeljeni s homogenimi variancami, je regresijski Williamsov test. Če podatki niso monotoni (kvadratni kontrast je statistično značilen, linearni kontrast pa ne), jih je treba analizirati z uporabo mešanega modela ANOVA. Pri podatkih je nato treba oceniti normalnost (priporoča se uporaba Shapiro-Wilkovega ali Anderson-Darlingovega testa) in homogenost varianc (priporoča se uporaba Levenejevega testa). Oba testa se izvedeta na ostankih iz mešanega modela ANOVA. Namesto teh formalnih testov za normalnost in homogenost varianc se lahko uporabi strokovna presoja, čeprav se priporoča uporaba formalnih testov. Če so podatki normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc, so izpolnjene predpostavke mešanega modela ANOVA in se znaten učinek tretiranja določi na podlagi Dunnettovega testa. Če je ugotovljena nenormalnost ali heterogenost varianc, potem predpostavke Dunnettovega testa niso izpolnjene in je treba poiskati normalizacijsko pretvorbo, ki stabilizira variance. Če take pretvorbe ni mogoče najti, se znaten učinek tretiranja določi z Dunnovim testom. Kjer je mogoče, je treba opraviti enostranski test, ne dvostranskega testa, vendar je za določitev, kateri je primeren za določeno končno točko, potrebna strokovna presoja.

Smrtnost

Podatke o smrtnosti je treba analizirati za obdobje, ki zajema celoten preskus, in jih izraziti kot delež osebkov, ki so poginili v posameznem akvariju. Paglavci, ki preobrazbe ne končajo v določenem časovnem okviru, paglavci, ki so v kohorti podvzorcev ličink, mlade žabe, ki so izločene, in vse živali, ki poginejo zaradi napake pri poskusu, je treba obravnavati kot cenzurirane podatke in se ne smejo vključiti v imenovalec izračuna odstotka. Pred kakršno koli statistično analizo je treba deleže smrtnosti pretvoriti z arkus-sinus-kvadratnokorensko transformacijo. Druga možnost je, da se uporabi regresijski Cochran-Armitageev test, po možnosti z Rao-Scottovo prilagoditvijo v primeru nadrazpršenosti.

Teža in dolžina (podatki o rasti)

Samci in samice med preobrazbo niso spolno dimorfni, zato je treba podatke o rasti na podlagi podvzorcev ličink analizirati neodvisno od spola. Vendar pa je treba podatke o rasti mladih osebkov analizirati ločeno na podlagi genetskega spola. Za te končne točke bo morda potrebna logaritemska transformacija, saj logaritemsko normalna porazdelitev podatkov o velikosti ni neobičajna.

▼M8

Jetrno-somatski indeks (LSI)

Teže jeter je treba normalizirati kot deleže tež celotnega telesa (tj. LSI) in analizirati ločeno na podlagi genetskega spola.

Čas do 62. faze NF

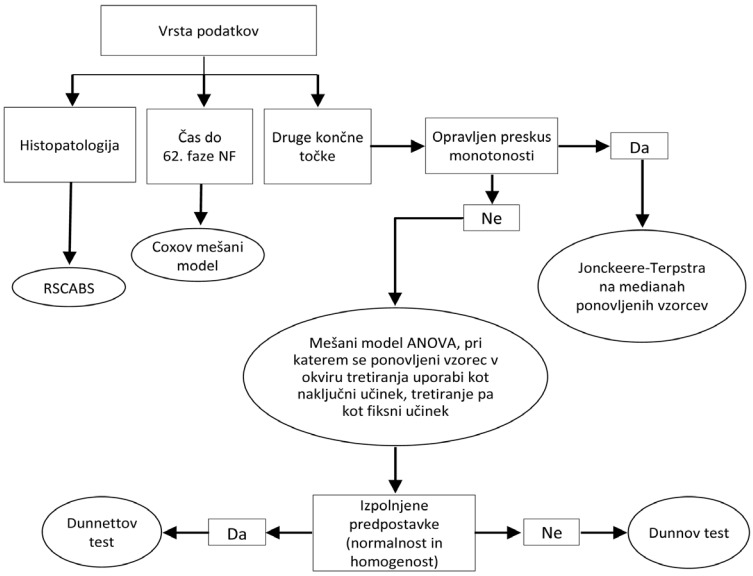
Podatke o času do preobrazbe je treba obravnavati kot podatke o času do dogodka, pri čemer se vsi pogini ali osebki, ki niso dosegli 62. faze NF v 70 dneh, obravnavajo kot desno cenzurirani podatki (tj. prava vrednost je večja od 70 dni, vendar se študija konča, preden so živali dosegle 62. fazo NF v 70 dneh). Za določitev datuma končanja preskusa je treba uporabiti srednji čas do končanja preobrazbe v 62. fazi NF v kontrolah z vodo za redčenje. Srednji čas do končanja preobrazbe je mogoče določiti s Kaplan-Meierjevimi cenilkami. To končno točko je treba analizirati z uporabo mešanega Coxovega modela sorazmernih tveganj, pri katerem se upošteva ponovitvena struktura študije.

Histopatološki podatki (ocene resnosti in razvojne faze)

Histopatološki podatki so v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz. Test, imenovan RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices), uporablja regresijski Cochran-Armitageev trendni test z Rao-Scottovo prilagoditvijo na vsaki stopnji resnosti v histopatološkem odzivu (Green *et al.*, 2014). Z Rao-Scottovo prilagoditvijo je v test vključen načrt poskusa s ponovitvenimi posodami. Postopek ‚by Slices' vključuje biološko pričakovanje, da se resnost učinka običajno poveča s povečanjem odmerkov ali koncentracij, pri čemer se ohranijo individualne ocene osebkov in razkrije resnost kakršnega koli ugotovljenega učinka. S postopkom RSCABS se ne samo določi, katera tretiranja se statistično razlikujejo od kontrol (tj. imajo težjo patologijo kot kontrole), ampak se določi tudi, pri kateri oceni resnosti nastopi razlika, s čimer se zagotovi zelo potreben kontekst za analizo. V primeru določitve razvojne faze spolnih žlez in spolnih vodov je treba za podatke uporabiti dodatno manipulacijo, ker je predpostavka RSCABS, da se resnost učinka povečuje z odmerkom. Opaženi učinek je lahko zakasnel ali prehiter razvoj. Podatke o določitvi razvojne faze je torej treba analizirati takoj, ko so zbrani, da se odkrije pospešitev razvoja, in nato ročno transformirati pred drugo analizo, da se zazna zakasnitev v razvoju.

Slika 1

Drevo odločanja za statistično analizo podatkov preskusa LAGDA



▼**M8**

VIRI

Green, J. W., Springer, T. A., Saulnier, A. N., in Swintek, J. (2014). Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108–1 116.

▼M8

Dodatek 8

PREUDARKI ZA ODKRIVANJE IN ZMANJŠEVANJE POJAVA SKOLIOZE

Zaradi idiopatske skolioze, ki so običajno kaže kot „ukrivljen rep“ pri paglavcih *Xenopus laevis*, se lahko morfološka in vedenjska opažanja pri preskusnih populacijah zapletejo. Zato si je treba prizadevati, da bi se pojavnost skolioze tako v staležu kot tudi v preskusnih pogojih čim bolj zmanjšala ali odpravila. Pri končnem preskusu je priporočljivo, da je prevalenca zmerne in hude skolioze manj kot 10-odstotna, zaradi izboljšanja zaupanja, da se lahko s preskusom odkrijejo s tretiranjem povezani učinki na razvoj sicer zdravih ličink dvoživk.

Pri dnevnih opažanjih med končnim preskusom je treba evidentirati pojavnost (štetje posameznih osebkov) in resnost skolioze, kadar je prisotna. Naravo nenormalnosti je treba opisati glede na mesto (npr. pred zadnjično odprtino ali za njo) in smer ukrivljenosti (npr. vstran ali od hrbtnega dela proti trebušnemu delu). Resnost se lahko oceni kot:

(NO) neopazna: ukrivljenost ni prisotna;

(1) minimalna: rahla ukrivljenost vstran za zadnjično odprtino; opazna samo pri mirovanju;

(2) zmerna: ukrivljenost vstran za zadnjično odprtino; vedno vidna, vendar ne ovira gibanja;

(3) huda: ukrivljenost vstran pred zadnjično odprtino; ALI vsaka ukrivljenost, ki ovira gibanje; ALI ukrivljenost od hrbtnega proti trebušnemu delu.

Znanstveno-svetovalni odbor US EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) je pregledal zbirne podatke za skoliozo pri petnajstih preskusih preobrazbe dvoživk pri *X. laevis* (51. faza NF do 60+) in zagotovil splošna priporočila za zmanjšanje prevalence te nenormalnosti pri preskusnih populacijah. Za preskus LAGDA so ta priporočila ustrezna, čeprav je z njim zajeto daljše razvojno obdobje.

Pretekla uspešnost mrestenja

Na splošno je treba kot pare za razmnoževanje uporabiti visokokakovostne zdrave odrasle osebke; z izločitvijo parov za razmnoževanje, katerih potomci imajo skoliozo, se lahko zmanjša njeno pojavljanje skozi čas. Zlasti je treba čim bolj zmanjšati uporabo živali za razmnoževanje, ujetih v naravnem okolju. Obdobje izpostavljenosti v preskusu LAGDA se začne z zarodki v 8–10. fazi NF, zato na začetku preskusa ni mogoče določiti, ali se bo pri zadevnih osebkih pokazala skolioza. Poleg sledenja pojavnosti skolioze pri živalih, ki so vključene v preskus, je torej treba dokumentirati preteklo uspešnost izvalitve (vključno s prevalenco skolioze pri vseh ličinkah, ki so se lahko razvile). Morda bo koristno nadalje spremljati delež vsake izvalitve, ki ni bil uporabljen v zadevni študiji, in poročati o teh opažanjih (FIFRA SAP 2013).

Kakovost vode

Pri laboratorijskem staležu in med preskusom je treba zagotoviti ustrezno kakovost vode. Poleg meril kakovosti vode, ki se redno ocenjujejo za preskuse toksičnosti za vodno okolje, je lahko koristno spremljati in odpraviti kakršna koli pomanjkanja hranilnih snovi (npr. pomanjkanje vitamina C, kalcija, fosforja) ali presežne ravni selena in bakra, za katere se poroča, da povzročajo različne stopnje skolioze pri laboratorijsko gojenih *Rana* sp. in *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; kot je navedeno v FIFRA SAP 2013). Kakovost vode in zdravje preskusnih osebkov se bosta na splošno izboljšala z uporabo ustrezne prehrane (glej Dodatek 4) in rednim čiščenjem akvarija.

▼M8

Prehrana

Posebna priporočila za prehrano, za katero je bilo v preskusu LAGDA ugotovljeno, da je uspešna, so podrobno navedena v Dodatku 4. Priporočljivo je, da se viri hrane pregledajo glede bioloških toksinov, herbicidov in drugih pesticidov, za katere je znano, da povzročajo skoliozo pri *X. laevis* ali drugih vodnih živalih (Schlenk in Jenkins 2013). Izpostavljenost nekaterim inhibitorjem holinesteraze je bila na primer povezana s skoliozo pri ribah (Schultz *et al.* 1985) in žabah (Bacchetta *et al.* 2008).

VIRI

Bacchetta, R., Mantecca, P., Andrioletti, M., Vismara, C., in Vailati, G. (2008). Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110–118.

Schultz, T. W., Dumont, J. N., in Epler, R. G. (1985). The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185–198.

Leibovitz, H. E., Culley, D. D., in Geaghan, J. P. (1982). Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322–328.

Marshall, G. A., Amborski, R. L., in Culley, D. D. (1980). Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445–453.

Martinez, I., Alvarez, R., Herraez, I., in Herraez, P. (1992). Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314–320.

Schlenk, D., in Jenkins, F. (2013). Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21.–23. maj, 2013. Washington, DC.